

PHYTOCHELATINE
DIE SCHWERMETALL-BINDENDEN PEPTIDE
DER HÖHEREN PFLANZEN

ERWIN GRILL

Disbui. München

1987



**PHYTOCHELATINE
DIE SCHWERMETALL-BINDENDEN PEPTIDE
DER HÖHEREN PFLANZEN**

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Erwin Grill
aus
München

Januar 1987

1. Referent: Prof. Dr. M.H. Zenk

2. Referent: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 1987

Meinen Eltern gewidmet

ABKÜRZUNGEN

Aminosäurereste (IUPAC-IUB 1966, 1969)

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein, (C* Cysteinsäure)
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Pro	P	Prolin
Phe	F	Phenylalanin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

BSO	Buthioninsulfoximin
CD	Circular-Dichroismus
Ci	Curie (1 μCi = $2,2 \cdot 10^6$ dpm)
cpm	Zählrate (counts per minute)
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl-
DNP	Dinitrophenyl
DTNB	Dithio-bis-nitrobenzoesäure, Ellman-Reagens
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FG	Frischgewicht
GSH	Glutathion
h-PC	Homo-Phytochelatin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
M ⁺	Massenpeak
M _r	Molekulargewicht
MT	Metallothionein
PC	Phytochelatin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Sulphydryl
SM	Schwermetall
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T _{R-X}	Retentionszeit der Substanz X
UV	Ultraviolett

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	13
1. Geräte und Chemikalien	13
2. Biologisches Material und Zellkulturtechnik	14
2.1. Organismen und Medien	14
2.2. Kultivierung und Ernte	15
2.3. Bestimmung von Zelldichte und Trockengewicht	16
2.4. Protoplasten- und Vakuolenisolierung	16
3. Nachweismethoden der Peptidisolierung	16
3.1. Proteinbestimmung	16
3.2. Schwermetallquantifizierung	17
3.3. Detektion von SH-Gruppen	17
4. Isolierung von Schwermetall-bindenden Peptiden	18
4.1. Zellaufschluß	18
4.2. DEAE-Säulenchromatographie	19
4.3. Ammonsulfatfällung	19
4.4. Ultrafiltration	20
4.5. Gelfiltration	20
4.6. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	20
5. Bestimmung der Aminosäuren	21
5.1 Cysteinmodifizierung	21
5.1.1. Carboxymethylierung	21
5.1.2. Benzylierung	22
5.1.3. Perameisensäureoxidation	22
5.2. Hydrolyse und Quantifizierung der Aminosäuren	23
5.3. Bestimmung der Stereokonfiguration	24

6.	Peptidsequenzierung	26
6.1.	Aminoterminal Aminosäuren	26
6.1.1.	Dinitrophenylierung	26
6.1.2.	γ -Glutamyltranspeptidase	26
6.2.	Carboxyterminale Aminosäuren	27
6.2.1.	Hydrazinolyse	27
6.2.2.	Carboxypeptidase	27
6.3.	Enzymatisch-chemischer Abbau	29
6.3.1.	Abspaltung des γ -Glutamylrestes	29
6.3.2.	Modifizierter Edmanabbau	29
6.4.	Partialhydrolyse	32
6.4.1.	Peptidmodifikation und limitierte Säurehydrolyse	32
6.4.2.	Zweidimensionale Trennung der Peptidfragmente	33
7.	Phytochelatinschnelltest	34
7.1.	Analytik	34
7.2.	Zellaufschluß	34
C.	ERGEBNISSE	36
1.	Nachweis eines induzierbaren, Cadmium- bindenden Peptidmaterials	36
1.1.	Wachstumshemmung durch Cadmium	36
1.2.	Aufnahme von Cadmium und Verteilung in der Zelle	38
1.3.	Induktion eines Cadmium-bindenden Peptidmaterials durch Cadmium	41
2.	Isolierung von Phytochelatin	45
3.	Charakterisierung des Phytochelatin- Cadmium-Komplexes	51
3.3.	UV- und CD-Spektrum	51

3.1.	Schwermetall- und Sulfhydryl-Gehalt	54
3.2.	Molekulargewicht	57
3.4.	Aminosäurezusammensetzung	61
4.	Primärstruktur der Phytochelatine	67
4.1.	Monomere des Phytochelatin-Cadmium-Komplexes	67
4.2.	Terminale Aminosäuren	70
4.3.	Enzymatisch-chemische Sequenzierung	76
4.4.	Sequenzbestimmung durch Partialhydrolyse	82
4.5.	Nonameres Phytochelatin	93
5.	Phytochelatin als Schwermetall-bindendes Prinzip höherer Pflanzen	95
5.1.	Induktion von Phytochelatin in verschiedenen pflanzlichen Zellkulturen mit Cadmium	96
5.2.	Induktion von Phytochelatin mit verschiedenen Schwermetallen	100
5.3.	Differenzierte Pflanzen	111
6.	Phytochelatine in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	116
6.1.	Isolierung und Sequenzierung von Phytochelatin aus <u><i>S. pombe</i></u>	117
6.2.	Induktion von Phytochelatin in <u><i>S. pombe</i></u> durch verschiedene Metalle	123
6.3.	Phytochelatinsynthese in Abhängigkeit von Wuchsphase und Cd-Konzentration	126
7.	Glutathion und Phytochelatin-Biosynthese	129
7.1.	Kinetische Untersuchung	129
7.2.	Inhibierung der Phytochelatin-Biosynthese mit Buthioninsulfoximin	132
7.3.	Homo-Phytochelatin	136
8.	Subzelluläre Lokalisation von Phytochelatin	143



D.	DISKUSSION	146
1.	Metallothioneine in Pflanzen ?	146
2.	Schwermetalltoleranz der Pflanzen	163
3.	Phytochelatin im Vergleich zu Metallothionein	173
E.	ZUSAMMENFASSUNG	184
F.	LITERATURVERZEICHNIS	188

A. EINLEITUNG

In allen Lebewesen ,vom Einzeller über die Pflanze zum Tier und Mensch, sind Schwermetalle in Spuren zu finden. Unser Interesse für diese Elemente beruht unter anderem auf ihrer wichtigen Funktion, die sie häufig in enzymatischen Reaktionen erfüllen, und auf ihrer Toxizität, die unter dem anthropogenen Einfluß, verbunden mit einer Zunahme an Metallen wie Cadmium, Blei und Quecksilber in der Biosphäre, von zunehmender Bedeutung ist.

Der essentielle Charakter einiger Schwermetalle wird durch bekannte Mangelercheinungen evident. So leiden etwa 4 Millionen Menschen in den USA an subakutem Zinkmangel. Im Vordergrund der vielfältigen Symptome dieses Syndroms stehen Störungen des Geschmacks- und Geruchsinns (Henkin et al. 1982). Ein Zinkmangel bei Pflanzen manifestiert sich häufig als Chlorose oder in verkümmerten und nekrotischen Gewebeteilen. Auf eine Kupferunterversorgung ist die Urbarmachungskrankheit des Getreides auf sauren Moorböden zurückzuführen.

Die biochemische Erklärung für diese Mangelkrankheiten liegt in der strikten Aktivitätsabhängigkeit mancher Enzyme von Schwermetallionen. Schwermetallionen wie Zn^{2+} und Cu^{2+} können als Lewis-Säure wirken und dadurch z.B. eine Carbonylbindung polarisieren, aber auch als konjugierte Säure eine Base bilden z.B. $\text{Zn}^{2+}-\text{OH}^-$ und auf diesem Weg an katalytischen Reaktionen beteiligt sein (Williams 1984). So benötigen beispielsweise Dehydrogenasen, Carboxypeptidasen, alkalische Phosphatase und Carboanhydrase Zink zu ihrer enzymatischen Aktivität, Kupfer viele Oxidasen, darunter Cytochrom-, Ascorbinsäure- und Monoaminoxidase, und Uricase (Kieffer 1984). Andere Schwermetalle sind ebenfalls notwendige Bestandteile funktioneller Moleküle, wie Eisen in Cytochromen,

Hämoglobin und Katalase, Chrom im Glucosetoleranzfaktor und Kobalt im Vitamin B₁₂. Pyruvatcarboxylase und Photosystem II der Chloroplasten benötigen Mangan, manche Oxidasen Molybdän, und aktive Urease enthält Nickel.

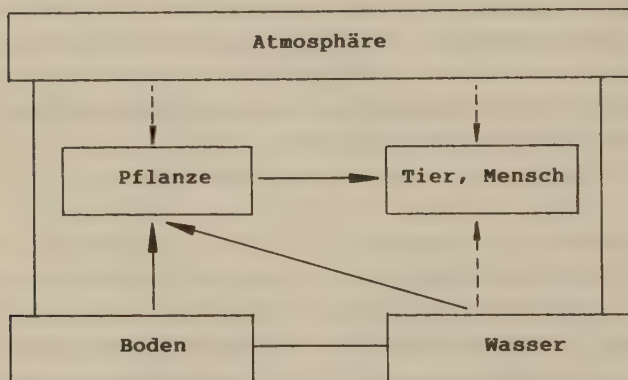


Abb. 1: Die Schlüsselfunktion der Pflanzen in der Schwermetallaufnahme von Tier und Mensch. Hauptwege der Schwermetallaufnahme sind durch durchgezogene Pfeile gekennzeichnet, Nebenwege durch unterbrochene Linien symbolisiert (modifiziert nach Umweltbundesamt, 1980).

Die Aufnahme dieser Schwermetalle erfolgt, wie in Abb. 1 ersichtlich, über den Raum Boden-Wasser-Luft bzw. durch Verzehr. Mensch und Tier nehmen Metalle hauptsächlich mit pflanzlicher bzw. tierischer Nahrung auf. Pflanzen dagegen absorbieren Schwermetalle als Ionen in erster Linie aus Boden und Wasser über die Rhizosphäre, zum geringeren Teil über die oberirdischen Organe aus der Atmosphäre. In den Luftraum gelangen Schwermetalle durch Verwitterungsprozesse und Emissionen vulkanischen oder anthropogenen Ursprungs und liegen gewöhnlich in Form von Aerosolen und Staubpartikeln vor.

Im Allgemeinen erfolgt die Schwermetallaufnahme der Lebewesen mit geringer Selektivität, so daß Metalle wie Zink und Kupfer über den eigentlichen Bedarf hinaus absorbiert werden und sogar toxische Konzentrationen erreichen können. Die toxische Wirkung der Schwermetalle beruht auf ihrer Eigenschaft, kovalent oder als Ionen mit Liganden wie organisch gebundenem Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel zu interagieren und dadurch Molekularstrukturen z.B. an Enzymen zu verändern, die für die Zelle lebensnotwendig sind (Merian 1984).

Um toxische Belastungen zu vermeiden, sollten Organismen generell die Fähigkeit entwickelt haben, Schwankungen in der zellulären Schwermetallkonzentration durch physiologische Inaktivierung auszugleichen.

Eine solche Aufgabe wurde dem SM-bindenden Protein Metallothionein zugeschrieben (Kägi und Vallee 1961). Metallothioneine sind im Tierreich ubiquitär. Sie konnten in Pilzen wie Neurospora (Lerch 1980) und Saccharomyces cerevisiae (Prinz und Weser 1975) nachgewiesen werden, in wirbellosen Tieren, nämlich Krabbe (Lerch et al. 1982) und Drosophila (Lastowski-Perry et al. 1985), bis zu den Wirbeltieren, einschließlich Säuger und Mensch.

Metallothioneine sind gekennzeichnet durch einen Cysteingehalt von 30-35 Molprozent und einen sehr hohen Schwermetallgehalt. Ein weiteres Charakteristikum dieser Proteine ist ein Molekulargewicht von 6-7 kDa. Die Komplexierung der SM-Ionen erfolgt über Thiolat-Komplexe im Verhältnis von 3 Sulfhydrylgruppen pro zweiwertiges Schwermetallion (Vallee 1979).

Metallothioneine von Neurospora und Drosophila erfüllen nicht alle die oben genannten Kriterien eines Metallothioneins insofern, als das Molekulargewicht dieser

'Proteine' mit 25 und 40 Aminosäuren deutlich von 6-7 kDa, das entspricht etwa 60 Aminosäuren, abweicht. Jedoch werden diese Moleküle aufgrund von Sequenzhomologien zu anderen Metallothioneinen ebenfalls als Metallothioneine angesehen (Lerch 1980, Lastowski-Perry 1985).

Kriterien zur Identifizierung von Metallothionein:
(Vallee 1979)

- 30-35 Mol% Cysteingehalt
- sehr hoher Schwermetallgehalt
- Schwermetall-Thiolat-Komplex
- keine aromatische Aminosäuren,
kein Histidin, keine Disulfide
- Metall²⁺/Sulphydryl-Relation 1:3
- Molekulargewicht 6-7 kDa

Am besten untersucht sind die Säuger-Metallothioneine. Erstmals aus der Pferdeniere isoliert (Margoshes und Vallee 1957), konnte das Säuger-Metallothionein als ein in der Primärstruktur stark konserviertes Protein aus 61 bzw. 62 Aminosäuren beschrieben werden (zusammenfassende Darstellung: Kägi und Nordberg 1979).



Abb. 2: Verteilung der Cysteinreste im Säuger-Metallothionein (aus Kägi und Nordberg 1979). Cys steht für Cystein.

Eine schematische Darstellung der Proteinsequenz mit der Verteilung der Cysteinreste ist in Abb. 2 gezeigt. Über die Sulfhydrylgruppen der Cysteine, die meist in Cys-X-Cys Anordnung in der Primärstruktur auftreten, werden ca. 7 Zink- oder Cadmiumionen pro Säuger-MT gebunden.

Die Chelierung der Metalle erfolgt in zwei als A und B bezeichneten 'Clustern' (Otvos und Armitage, 1980). Domäne A, die carboxyterminale Proteinhälfte mit 11 Cysteinen, bindet in kooperativer Weise 4 divalente Kationen und Domäne B mit 9 Cysteinresten 3 Metallionen, jeweils mit tetraedraler Ligandierung (Boulanger et al., 1983; Nielson und Winge, 1983). Ein genaueres Modell der räumlichen Anordnung der Metall-'Cluster' erbrachte die kürzlich erfolgte Bestimmung der Röntgenkristallstruktur von Ratten-MT mit einer Auflösung von 2,3 Å (Furey et al. 1986). Die aus diesen Daten ableitbare räumliche Struktur ist in Abb. 3 zu sehen.

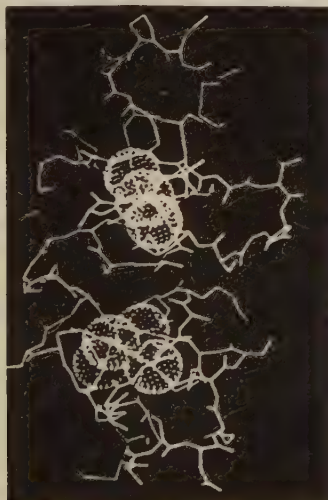


Abb. 3: Räumliche Darstellung von Ratten-Metallothionein abgeleitet von Daten der Röntgenkristallstruktur-Analyse. Punktiert dargestellt sind Cadmium- und Zinkatome (aus Furey et al. 1986).

Wie schon zuvor erwähnt, sind die MT in ihrer Primärstruktur nahezu unverändert im Säuger bewahrt worden. Ein Vergleich der Proteinsequenzen, direkt bestimmt oder aus MT-Genen deduziert, von MT aus Pferd (Kojima et al. 1976), Mensch (Kissling und Kägi 1977), Maus (Huang et al. 1977), Kaninchen (Kimura et al. 1979), Ratte (Kissling et al. 1979), Hamster (Griffith et al. 1983) und Affe (Schmidt und Hamer 1983) zeigte eine nahezu perfekte Übereinstimmung in der Anordnung der Cysteinreste und eine geringe Variation der anderen Aminosäuren. Häufig konnten zwei oder mehrere isoforme MT in den einzelnen Säugern nachgewiesen werden, die aufgrund von Sequenzvergleichen der Gene durch Genduplikation vor über 20 bzw. 70 Millionen Jahren entstanden sein müssen (Griffith et al. 1983).

Beides, die starke Konservierung der Protein- und Gensequenzen und die allgemeine Verbreitung der Metallothioneine im Tierreich, ist Zeugnis für die grundlegende Bedeutung dieser Moleküle für den tierischen Organismus. Seit der ersten eingehenden Charakterisierung eines Metallothioneins wurde eine Funktion dieses Proteins in der Detoxifizierung und Homöostase von SM angenommen (Kägi und Vallee 1961). Bis heute, 25 Jahre danach, konnte erst die detoxifizierende Funktion der MT belegt werden.

Ein erster Hinweis auf eine SM-Detoxifizierung durch MT war die Induktion dieser SM-bindenden Moleküle nach Verabreichung von Cadmium, Zink oder Kupfer (Squibb und Cousins 1974). Die Induktion der Metallothioneine ließ sich auf eine verstärkte Transkription der MT-Gene zurückführen (Squibb und Cousins 1977). Molekularbiologische Untersuchungen mit den klonierten Säuger-MT-Genen zeigten, daß über promoterbenachbarte Regulationssequenzen die Transkription von MT m-RNA induziert werden kann. Solche Regulationssequenzen für das MT-Gen sind

spezifisch für die MT-Induktoren Schwermetall, Glucocorticoidhormon (Karin et al. 1984) oder α -Interferon (Friedman und Stark 1985). So führte die Expression eines Wachstumshormongenes unter der Kontrolle eines MT-Promotors nach Integration in die Mauskeimbahn und zinkreicher Diät der jungen transgenen Mäuse, zu erhöhter Hormonproduktion und gesteigertem Wachstum (Brinster und Palmiter 1982).

Ein klarer Hinweis auf eine SM-detoxifizierende, zelluläre Aufgabe der MT erbrachte ein Versuch, in dem Säugerzellen mit einem MT-Gen enthaltenden Virusvektor transformiert wurden (Karin et al. 1983). Die Zellen enthielten den Virusvektor in hoher Kopienzahl. Unter SM-Streß konnten diese Säugerzellen aufgrund eines Gen-Dosis-Effektes vermehrt MT synthetisieren und zeigten sich SM-resistenter als nicht transformierte Zellen. Ein weiterer überzeugender Hinweis konnte mit SM-resistenten Zellen erhalten werden. Sowohl SM-resistente Säugerzelllinien (Beach und Palmiter 1981, Gick und McCarty 1982) als auch SM-tolerante Saccharomyces cerevisiae (Fogel und Welch 1982) besaßen eine durch Amplifikation erhöhte Kopienzahl des MT-Genes gegenüber nicht resistenten Zellen.

SM-resistente Pflanzen sind ebenfalls bekannt. Zinktolerante Pflanzen wie Silene cucubalus, Thlaspie alpestre und Viola calaminaria sind schon lange beschrieben und unter der Bezeichnung Galmeipflanzen zusammengefaßt worden (Baumeister 1969). Ob diese Pflanzen ein möglicherweise zu forderndes, SM-bindendes Protein überproduzieren wäre eine interessante Frage.

Schwermetallanalysen solcher Pflanzen dokumentierten, daß die Metalle in beträchtlichem Maße, bis zu Prozenten des Trockengewichts, aufgenommen werden (Ernst 1974). Die Tatsache, daß Pflanzen hohe SM-Gehalte an z.B. Zink und Kupfer enthalten können, führte Jowett bereits 1958

zu der Forderung nach einem spezifischen SM-Entgiftungsmechanismus in Pflanzen (Jowett 1958).

Prinzipiell ist eine SM-Toleranz durch selektiven Ausschluß oder Efflux der SM denkbar. Zelltoxische Wirkungen der Metalle ließen sich auch durch physiologische Inaktivierung der SM in der Pflanze vermeiden, z.B. durch Kompartimentierung oder spezifische, hochaffine Komplexierung an zelluläre Moleküle. Auch eine Resistenz basierend auf einer Adaption der pflanzlichen Enzyme an hohe SM-Konzentrationen wurde postuliert (Wainwright und Woolhouse 1975).

Die Aufnahme der Schwermetalle bei Pflanzen erfolgt gewöhnlich über die Rhizosphäre. Der Vorgang läßt sich in zwei Phasen einteilen (Broda und Findenegg 1966): Die Aufnahme in den freien Raum der Wurzelzellwände und die Absorption in das Zellinnere, die in aktiver, metabolisch gesteuerter Weise durch Carriersysteme erfolgen soll (Hart et al. 1979, Cataldo et al. 1983).

Der erste Schritt der Aufnahme hängt von der Kationenumtauschkapazität der Wurzeln ab, einer genetisch fixierten Eigenschaft (Mouat 1962), die allerdings in wenigen Fällen z.B. bei Silene cucubalus durch Reduzierung der verfügbaren Ionenbindungsstellen als Ursache der SM-Resistenz erkannt wurde (Ernst 1974). Die Aufnahme divalenter SM in das Zellinnere erfolgt kompetitiv mit freien Calciumionen und ohne selektive Diskriminierung toxischer SM (Ernst 1974). Die Verwendung von Dinitrophenol als metabolischem Inhibitor verhinderte die Aufnahme von Schwermetallionen über die Wurzel nahezu vollständig (Cataldo et al. 1983). Die Absorption von Cd^{2+} ließ sich auch durch andere zweiwertige Ionen wie Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} und Mn^{2+} inhibieren und ein diesen Ionen gemeinsamer Weg der Aufnahme wurde angenommen. Eine selektiver SM-Ausschluß in Pflanzen, z.B. durch hochspe-

zifische Carrier ist bislang nicht bekannt.

Auch wurde für Pflanzen kein Effluxsystem für SM-Ionen wie bei manchen Bakterien beschrieben. In Staphylokokken beruht eine plasmidcodierte Cadmiumresistenz auf einem selektiven Ausschleusen der SM-Ionen aus der Zelle (Tynecka et al. 1981). Auf den gleichen Mechanismus ist eine Arsenatresistenz bei Escherichia coli (Mobley und Rosen 1982) und bei Staphylococcus aureus (Keach und Silver 1982) zurückzuführen.

Dagegen sind bei SM-resistenten Pflanzen Beispiele von Kompartimentierung der SM bekannt. In zinkresistenten Populationen von Agrostis tenuis und A. stolonifera waren bis zu 90% des gebundenen Zinks mit der Zellwand assoziiert, in nicht resistenten weniger als die Hälfte (Turner 1970). Eine Zinkspeicherung in Vakuolen und gleichzeitige Chelierung mit organischen Säuren wie Malat und Oxalat wurde an Silene cucubalus festgestellt (Mathys 1977). Eine Akkumulation von Zink in der Vakuole wurde auch bei Gräsern gefunden (Brookes et al. 1981) und von Nickel bei Hybanthus-Arten (Kelly et al. 1975).

Eine weitere Form der SM-Toleranz stellt die spezifische Chelierung der toxischen Ionen an spezifische Proteine dar. SM-bindende Proteine wurden sowohl in einem SM-resistenten Gras, als auch in verschiedenen SM-empfindlichen Pflanzen nachgewiesen. Vergleichende Untersuchungen von resistenter und sensitiver Pflanze gleicher Spezies könnten Aufschluß über die Beteiligung solcher Proteine an der SM-Resistenz geben.

1975 wurde erstmals ein cysteinreiches, SM-bindendes Protein von Pflanzen, nämlich von Keimlingen der Mungobohne identifiziert (Premakumar et al. 1975). Im Rahmen einer Reihenuntersuchung verschiedener Cu-belasteter Eukaryonten im Hinblick auf die Bindung des SM, konnten

die Cu-Ionen in der Mungobohne hauptsächlich assoziiert mit einem cysteinreichen (ca. 15% Molprozent Cystein) Protein von 8 kDa nachgewiesen werden. Das Cu-haltige Protein unterschied sich von MT aufgrund einer höheren elektrophoretischen Mobilität und eines anderen Verhaltens während der Ionenaustauschchromatographie. Es wurde als Kupferchelatin bezeichnet. Es konnte jedoch von Nicholson et al. (1980) aus Mungobohnen nicht isoliert werden, vielmehr identifizierten sie nach Kupferbelastung Plastocyanin als das Protein an das ein Großteil des Kupfers gebunden war.

Casterline und Barnett (1977) beschrieben ein Cd-bindendes Protein aus Sojapflanzen, das induzierbar war und ein Molekulargewicht von 13,8 kDa aufwies. Es befand sich im Überstand von ultrazentrifugierten Blatt-, Stengel- oder Wurzelhomogenaten Cadmium-belasteter Pflanzen.

Weigel und Jäger (1980) untersuchten die subzelluläre Verteilung und chemische Form von Cadmium in Bohnen (Phaseolus vulgaris). Das Cadmium, über die Nährlösung appliziert, war in erster Linie in der Wurzel lokalisiert, zum geringen Teil im Blatt und in diesem zu mehr als 70% in der cytoplasmatischen Fraktion zu finden. Durch Gelfiltration und Aminosäureanalyse konnte die Bindung dieses Metalles an niedermolekulare Proteine oder Peptide mit einem Molekulargewicht von 5-10 kDa in der Wurzel und 0,7-5 kDa im Blatt bestimmt werden. Nur Spuren von Cadmium lagen in der Bohnenpflanze als freie Ionen vor.

Aus Cd-belasteten Tomatenpflanzen (Lycopersicon esculentum) isolierten Bartolf et al. (1980) ein Cd-bindendes, induzierbares 10 kDa Protein, das ein MT-charakteristisches UV-Absorptionsspektrum zeigte, sich aber in der Gelelektrophorese durch ein hochanionisches Verhalten unterschied, letzteres möglicherweise ein Isolationsartefakt, bedingt durch phenolische Oxidationsprodukte.

Als pflanzliches Metallothionein, expressis verbis, bezeichneten Rauser und Curvetto (1980), gestützt auf UV-Absorptionsspektrum und Aminosäureanalyse, ihr Cu-bindendes Protein aus Kupfer-tolerantem Straußgras Agrostis gigantea. Die nicht bis zur Homogenität gereinigte Substanz wurde im denaturierenden Polyacrylamidgel als ein 14,4 kDa Protein bestimmt. Die Aminosäurezusammensetzung ergab als häufigste Komponenten Cystein, Glycin, Glutamat, Aspartat und Serin.

Casterline und Barnett (1982) fanden in ihren Untersuchungen an Sojabohne, Glycine max, nach Applikation von radioaktivem Cd^{109} , das Radionuklid spezifisch mit einem induzierbaren 'Cd-Thionein' von 13,8 kDa Molekulargewicht assoziiert. Das Protein zeigte eine säurelabile Absorption bei 250nm, ein mit einem Cd-Thiolat-Komplex im Einklang stehendes Phänomen.

Ein Cd-bindendes 10 kDa Protein reinigten Wagner und Trotter (1982) aus wässrigen Extrakten von entsprechend belastetem Rotkohl (Brassica oleracea var. capitata) und Tabak (Nicotiana glauca x langsдорffii). Der Gehalt der Pflanzen an diesem SM-bindenden Protein, das als MT-ähnlich bezeichnet wurde, war abhängig von der SM-Konzentration und der Dauer der SM-Exposition.

Ausgehend von diesen Befunden stellte sich in der vorliegenden Arbeit die Aufgabe, SM-bindende, pflanzliche Proteine zu isolieren und eingehend zu charakterisieren; zum einen, um damit die Frage nach der Existenz von Metallothioneinen in Pflanzen beantworten zu können, zum anderen, um damit Vorarbeiten zur Klonierung solcher, vermutlich induzierbaren Pflanzengene zu leisten.

Im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die ein SM-bindendes Protein in differenzierten Pflanzen nachwiesen, sollten in dieser Arbeit pflanzliche Zellsuspensionskulturen verwendet werden. Diese Kulturen bieten den Vorteil, daß ihre Stoffwechselaktivität gegenüber der differenzierter

Pflanzen deutlich gesteigert ist. Darüber hinaus können die Zellen als homogene Suspension mit Schwermetallösungen versetzt werden. Dadurch werden die Pflanzenzellen einheitlich und direkt mit den Schwermetallionen belastet und zusätzliche Transportphänomene im Vergleich zu differenzierten Pflanzen vermieden. Auch können auf geringem Raum, vergleichbar den Bakterien- und Hefekulturen, Kilogramm-Mengen an sterilem Pflanzenmaterial kultiviert werden. Aus diesen Gründen ist es naheliegend, pflanzliche Zellsuspensionskulturen zur Untersuchung des Schwermetallmetabolismus einzusetzen.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Geräte und Chemikalien

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde nachstehende Geräte und Arbeitsmaterialien verwendet.

	Instrumentation	Chemikalie und Material
Protein- isolierung	Fraktionskollektor Ultrarac10000	Gelmaterial:
	UV-Detektor Uvicord 2000, Pumpe	Sephadex G-10, G-25, G-50
	Varioperpex 2000 (LKB, Schweden)	(Pharmacia, Schweden)
	Ultrafiltrationsapp. und Membran	P-4, P-6, DEAE-Biogel
	YM 2 (Amicon, Düren)	(Bio-Rad, USA)
	Autom. HPLC Anlagen (Spectra Phytics und Waters-Millipore, USA)	HPLC-Säule Nucleosil C18, 10 µm, 4x250 bzw 16x250 mm (Macherey und Nagel, Düren)
	Zellmühle Vibrogen (Bachofer, Reutlingen)	
	Zentrifugën: Sorvall Superspeed RC 58 (Du Pont, USA), Eppendorf Typ 5412 (Eppendorf, Hamburg)	Ellman Reagens, 5,5'-2,2'-Dithio-benzoesäure (Sigma, München)
Protein- sequenzierung	Aminosäureanalysator Liquimat III (Kontron, Schweiz)	Diaminobenzylisothiocyanat (Fluka, Schweiz), Dinitrofluorbenzol (Sigma, München)
	Massenspektrometer Finnigan MAT 44 S (Varian, USA)	Pyridin, Isothiocyanat und 6 N HCl (Pierce, USA)
Biochemische Charakteri- sierung	Spektralphotometer DMR 11 (Zeiss, Oberkochen)	L-Buthionin-(S,R)-Sulfoximin (Sigma, München)
	Cirkulardichroismus: Spektropolarimeter J 500C (Jasco, USA)	
	Atomabsorptionspektrometer (Perkin-Elmer 300, USA)	

2. Biologisches Material und Zellkulturtechnik

2.1. Organismen und Medien

Pflanzen und pflanzliche Zellsuspensionskulturen, die im Rahmen dieser Untersuchungen verwendet wurden, sind mit den jeweiligen Nährlösungen nachstehend aufgeführt. Zuweilen wurden die Zellen in den entsprechenden Nährmedien ohne Zink- und Kupfersalze kultiviert.

Pflanze	Zellkultur (K) bzw. intakte Pflanze (P)	Medium
<u>Angiospermae</u>		
Dikotyledonae:		
<i>Agrostis tenuis</i>	K	LS
<i>Brassica oleracea</i>	P	H
var. <i>capitata</i>		
<i>Eichhornia crassipes</i>	P	H*
<i>Lycopersicon esculentum</i>	P	H
<i>Rauvolfia serpentina</i>	K	LS
<i>Rosa canina</i>	K	LS
<i>Silene cucubalus</i>	K	LS
<i>Glycine max</i>	P	H
Monokotyledonae:		
<i>Dioscorea composita</i>	K	LS
<i>Secale cereale</i>	K	LS
<i>Zea mays</i>	P	H
<u>Gymnospermae</u>		
<i>Abies grandis</i>	K	4X
<i>Picea abies</i>	K	4X

Pflanzenmaterial und Nährmedien:

LS, Medium nach Linsmaier und Skoog (1965); H, Hoagland und Snyder (1933); 4X, Gamborg et al. (1968), modifiziert nach Ulbrich und Zenk (1979). * Medium 10-fach verdünnt

Eichhornia crassipes wurde dem Lehrstuhl vom Botanischen Garten, München, zur Verfügung gestellt. Alle anderen Pflanzen konnten aus Samen gezogen werden, die über die Samengroßhandlung Schmitz, München, bezogen worden waren. Die Kalluskultur von R. canina stammt aus der Pflanzenzellkultursammlung von Dr. King, Miescher Institut, Basel, ansonsten wurden alle verwendeten Zellkulturen vom hauseigenen Zellkulturlabor angelegt, dem an dieser Stelle mein großer Dank ausgesprochen sei.

Die Spaltheife Schizosaccharomyces pombe, Wildtyp L 972 (h⁻) wurde freundlicherweise von Prof. Wolf, München, zur Verfügung gestellt. Der Mikroorganismus konnte in einem Luria-Medium mit 20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt und 20 g Glucose, pH 7.2, pro Liter kultiviert werden.

2.2. Kultivierung und Ernte

Pflanzen wurden unter Licht (1200 lux, 12 h/Tag) und Belüftung (0,5 l Preßluft/ h⁻¹ Nährlösung) bei 22°C mit wöchentlicher Erneuerung des Nährmediums kultiviert. Gewaschene und abgetrocknete Gewebeteile, z.B. Wurzel oder Blatt, wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Suspensionkulturen wurden in einem Rhythmus von 7 Tagen 20-30 %-ig überimpft. Die Kultivierung erfolgte in einem thermostatisierten Raum mit 70% Luftfeuchte und 23°C bei Dauerlicht (600 lux) und 100 Umdrehungen pro Minute (New Brunswick Schüttler). Durch Vakuumfiltration wurde das Gewebe geerntet, wie oben schockgefroren und gelagert.

Die Spaltheife wurde in einem Wasserbadschüttler (250 Umdrehungen/min, New Brunswick) bei 30°C kultiviert. Zur Großanzucht konnte ein 20 l Fermenter mit steriler Preßluftbegasung (10 l/min) eingesetzt werden. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation des Mediums.

2.3. Bestimmung von Zelldichte und Trockengewicht

Die Zelldichte einer homogenen Zellsuspension ließ sich durch Auszählen von aliquoten Teilen in einer Zählkammer (Zeiss, Oberkochen) unter Zuhilfenahme eines Mikroskops ermitteln. Das Trockengewicht des pflanzlichen Gewebes wurde nach 2 tägiger Inkubation im Trockenschrank bei 70°C an einer Feinwaage bestimmt. Die Werte wurden generell durch eine Doppelbestimmung gewonnen.

Bakterienkonzentrationen konnten durch Messung der optischen Dichte bei 660 nm erfaßt werden. Verdünnungsreihen und Plattierungen ergaben einen Wert von 10^6 Zellen/ $0,14 \text{ OD}_{660\text{nm}}$.

2.4. Protoplasten- und Vakuolenisolierung

Die Protoplastenisolierung wurde nach der von Schieder (1975) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit unter nicht sterilen Bedingungen.

Die Vakuolen konnten nach der Methode von Grob und Matile (1979) erhalten werden. Nähere Einzelheiten sind auch der Arbeit von Deus-Neumann und Zenk (1984) zu entnehmen.

3. Nachweismethoden der Peptidisolierung

3.1. Proteinbestimmung

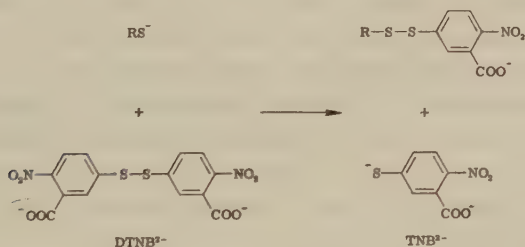
Proteinkonzentrationen wurden nach einem Testverfahren von Lowry et al. (1951) modifiziert nach Bensadoun und Weinstein (1976) ermittelt. Zuverlässig und empfindlich (Nachweisgrenze $0,5 \mu\text{g}$ Protein) erwies sich die Methode von Bradford (1976). Rinderserumalbumin (Boehringer, Mannheim) diente in beiden Verfahren als Standard.

3.2. Schwermetallquantifizierung

Die Metalle Cd, Cu, Zn, Sn, Ag und Au konnten mittels Atomabsorptionsspektrometrie quantitativ mit einer Nachweisgrenze von 0,01 - 0,5 µg/ml erfaßt werden. Voraussetzung dafür war, daß diese Elemente als Ionen in schwebteilmfreier Lösung vorlagen. Deshalb war es notwendig, Proben mit festen Bestandteilen, wie Blätter oder Zellen mit Hilfe von konzentrierter Schwefel- und Salpetersäure unter Erhitzung naß zu veraschen. Alle für die Messung vorbereiteten Proben wurden auf einen Schwefelsäureanteil von 3% eingestellt und 5 Minuten bei 11 000 x g zentrifugiert. Der Metallgehalt des Überstandes wurde in der Flamme (Acetylen-Luft Gemisch) gemessen.

3.3. Detektion von Sulfhydrylgruppen

Als Nachweisreagens für Sulfhydrylgruppen diente Dinitrothiobenzoesäure (DTNB), Ellman-Reagens (Ellman 1959), das mit SH-Gruppen nach folgendem Schema reagiert.



Dabei wird ein gelb gefärbtes Thiolatanion (TNB^{2-}) gebildet, das mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 410 nm zu quantifizieren ist (Riddles et al. 1983).

Aliquote Teile der zu bestimmenden Lösungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,3, aufgenommen und mit

1/4 Volumen Reagenslösung versetzt, die aus dem zuvor genannten Puffer mit 10 mM EDTA und 3 mM Ellman-Reagens bestand. Nach 10 minütiger Reaktion wurde die Gelbfärbung photometrisch ausgewertet. Für Serienbestimmungen empfahl sich die Verwendung von 96 Loch-Titerplatten (Nunc, USA) - Gesamtvolumen pro Ansatz 250 µl - und einem schnellmessenden, geeigneten Photometer (Dynatec, USA), um Luftoxidation zu vermeiden.

Exakte Quantifizierungen wurden im Millilitermaßstab mit Stickstoff-begasten Lösungen durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen lag die unspezifische Oxidation unter 1%. Cystein-Hydrochlorid diente als Eichsubstanz.

4. Isolierung von Schwermetall-bindenden Peptiden

4.1. Zellaufschluß

Mit flüssigem Stickstoff eingefrorenes, Schwermetall-belastetes Pflanzenmaterial, in der Regel 0,5 kg, wurde in der halben Gewichtsmenge Puffer, 10 mM Mercaptoethanol und 10 mM Tris-Cl pH 8,6, suspendiert und unter Rühren aufgetaut. Um einen guten Zellaufschluß bei differenziertem Pflanzengewebe zu erzielen, mußte zuvor das gefrorene Material mit Mörser und Pistill fein zermahlen werden. So erhaltenes Homogenat wurde durch vier Lagen Mull gepreßt und der wässrige Extrakt bei 10 000 x g, 30 min zentrifugiert. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten bei 0-4°C.

Im Falle von Schizosaccharomyces pombe wurden SM-belastete Zellen mit Glaskügelchen aufgeschlagen. Dazu wurde die durch Zentrifugation der Hefekultur erhaltene Zellpaste, ca. 70 g/ 10 l, mit 1/9 Volumen 1 M Tris-Cl, pH 8,6 versetzt und mit feinen Glasperlen (Ø 0,18 mm) zu einem festen Brei vermengt. In einen passenden Stahlbe-

cher gefüllt, konnten die Zellen vollständig innerhalb 25 Minuten in einer wassergekühlten Zelmühle (Vibrogen, Bachofer, Reutlingen) aufgebrochen werden. Durch Vakuumfiltration über eine G-10 Glasfritte (Schott, Mainz) und Nachwaschen mit 10 mM Tris-Cl Puffer, pH 8,6, wurde der Rohextrakt als Filtrat erhalten. Daran schloß sich ein Zentrifugationsschritt ($15\ 000 \times g$, 30 min) an, um Zellpartikel zu entfernen. Der zellfreie Extrakt wurde auf 0,5 l mit entgastem Wasser verdünnt und wie nachstehend, identisch dem pflanzlichen Extrakt, gereinigt.

4.2. DEAE- Säulenchromatographie

Der Zentrifugationsüberstand des pflanzlichen Homogenats wurde mit 1 N NaOH auf pH 8,6 eingestellt und mit entgastem H_2O so lange verdünnt (2 - 3 Volumen) bis die Leitfähigkeit unter 1 kS lag. Dann folgte die Chromatographie des Extraktes über eine DEAE-Biogelsäule (2,5 x 25 cm) mit 0,4 l/h, die bereits mit 10 mM Tris-Cl Puffer pH 8,6 äquilibriert war. Anschließend wurde die Säule mit 250 ml Puffer, pH 8,6, gewaschen, und gebundenes Proteinmaterial durch Puffer plus 0,5 M NaCl eluiert. Die Elution ließ sich aufgrund einer leicht bräunlichen Färbung des Proteinmaterials, oder durch Messung der UV-Absorption verfolgen. Das Volumen der Proteinfraktion betrug 20-40 ml.

4.3. Ammonsulfatfällung

Das Eluat der DEAE-Säule wurde mit feingemahlenem Ammoniumsulfat unter Rühren portionsweise bis zur 85% Sättigung versetzt, das entspricht 0,6 g $(NH_4)_2SO_4$ / ml. Danach konnte nach einstündigem Rühren präzipitiertes Proteinmaterial durch Zentrifugation ($10\ 000 \times g$, 15 min) entfernt werden. Daran schloß sich eine Ultrafiltration an.

4.4 Ultrafiltration

Um die Ammonsulfat-haltige Lösung zu entsalzen, wurde der Überstand der Ammonsulfatfällung mit einem Volumen Puffer versetzt und mit einer Ultrafiltrationsapparatur eingeeengt, die Moleküle über 1 kDa zurückhielt (Amicon, YM 2). Durch wiederholtes Einengen und Verdünnen mit Puffer ließ sich das Ammonsulfat auswaschen und letztlich ein Konzentrat von 4 - 6 ml erhalten.

4.5. Gelfiltration

Für die anschließende Gelchromatographie wurde ein Säulenmaterial eingesetzt, das Proteine im Molekulargewichtsbereich von 1,5 - 30 kDa trennt. Zur Trennung der nach Ultrafiltration erhaltenen Proteinlösung wurde ein 5 mM Ammoniumacetatpuffer (mit Ammoniak auf pH 7,5 eingestellt) und eine Sephadex G-50 Säule (2,5 x 52 cm) verwendet. Nach Auftragen der entsalzten Probe erfolgte die Chromatographie mit 74 ml und 10 Fraktionen pro Stunde. Die Elution ließ sich durch kontinuierliche Absorptionsmessung bei 254 nm verfolgen. Sulfhydrylgruppen und Cadmium (siehe B 3.2 bzw. B 3.3) enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Das im Laufpuffer vorhandene Ammoniumacetat sollte nach Gefriertrocknung sublimiert sein. Um absolut salzfreies Material zu erhalten, wurde wahlweise eine zweite Gelfiltration mit Sephadex G-25 (1,5 x 25 cm) in H₂O_{bidest} durchgeführt.

Das gefriergetrocknete Produkt wurde als **Phytochelatin** bezeichnet.

4.6. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Sowohl für analytische als auch präparative Zwecke kam eine C 18 'reversed phase'-Säule (Nucleosil, 10 µm) zum

Einsatz. Die Trennung erfolgte unter Metall-Thiolat-dissoziierenden Bedingungen über einen linearen, sauren Gradienten von 0-20% Acetonitril in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit 0,05% Phosphorsäure, pH 2,2, mit Detektion bei 220 nm.

Analytische Bestimmungen wurden mit einer 4,6 x 250 mm Säule und 2 ml Fluß pro Minute in 20 min durchgeführt. Die automatischen HPLC-Anlagen injizierten 5-250 µl der Probe, das entsprach 10-1000 µg des in Wasser gelösten Phytochelatins.

Präparative Trennungen konnten mit einer 16 x 250 mm Säule, 10 ml/ min Fluß und einem 40-minütigen Gradienten vorgenommen werden. Bis zu 20 mg des auf pH 1,5 eingestellten Phytochelatins wurden pro Lauf chromatographiert. Es empfahl sich, die Laufmittel mit einer flüchtigen Säure anzusäuern, wie 0,02% HCl oder besser, wegen geringerer Korrosivität, 0,1% Trifluoressigsäure.

5. Bestimmung der Aminosäuren

5.1. Cysteinmodifizierung

5.1.1. Carboxymethylierung

Die Carboxymethylierung der SH-Gruppe von Cystein wurde mit Jodacetat-Natriumsalz (Sigma, München) unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Die Probe, z.B. 3 mg Phytochelatin oder 10-12 µMol Sulfhydryl-(SH)-Gruppen wurden mit 16 µMol Dithioerythrit in 100 µl 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ Puffer, pH 8,6, 30 Minuten bei 42°C reduziert. Nach Zugabe von EDTA (4 µMol) und Portionen von festem Jodacetat, insgesamt 48 µMol, erfolgte die S-Carboxymethylierung. Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde durch Zupipettieren von 5 N NaOH (etwa 40 µMol) im Bereich 8-9 gehalten. Nach 1 stündiger Reaktion wurde eingesetztes Peptidmaterial

durch Gelfiltration (Sephadex G-10 in H_2O , 10 ml) entsalzt (Ausbeute: 72%).

Hydrolyse und Aminosäureanalyse zeigten für Glutathion eine Carboxylierungsrate von 83%.

5.1.2. Benzylierung

Die S-Benzylierung erfolgte ebenfalls unter Stickstoffatmosphäre mit Benzylbromid als Reagens modifiziert nach (Frankel et al. 1960).

In 200 μ l Puffer, 50 mM $(NH_4)_2CO_3$ in 50% ethanolischer Lösung befanden sich 2 mg Phytochelatin oder 8 μ Mol reduzierte Sulfhydrylgruppen. Zu diesem Ansatz wurden 4 μ Mol EDTA und 10 μ Mol Benzylbromid gegeben. Sukzessive Zugabe von insgesamt 8 μ Mol NaOH hielt den pH-Wert des Ansatzes im schwach alkalischen Bereich (pH 9 - 10). Nach 30 minütiger Umsetzung konnte die Probe mit Stickstoff zur Trockne abgeblasen werden.

S-benzyliertes Cystein wird durch saure Hydrolyse weitgehend zerstört. Deshalb wurde die Umsatzrate durch einen unspezifischen Abbau mit Peptidasen (siehe B 5.3.2.) und anschließender, quantitativer Aminosäureanalyse ermittelt. Sie betrug ca. 80%.

5.1.3. Perameisensäureoxidation

Die Perameisensäure wurde durch 2 stündige Inkubation von Ameisensäure (900 μ l) und 30% Wasserstoffperoxid (100 μ l) frisch hergestellt.

Zu 50 μ l in Wasser gelöster Probe mit maximal 20 μ Mol SH-Gruppen wurde 1 Volumen Ameisensäure und 4 Volumen eiskalter Perameisensäure pipettiert. Nach 90 minütiger Reaktion in Eis, konnte der Ansatz zur Trockne abgeblasen, in 4 Volumen 50% ethanolischer Lösung aufgenommen und erneut abgeblasen werden. Der Umsatz von Cystein zur Cysteinsäure war größer als 97%.

5.2. Hydrolyse und Quantifizierung der Aminosäuren

Die Hydrolyse erfolgte unter Sauerstoffabschluß in 6 N HCl bei 110°C.

1-10 µMol Peptid- bzw. Proteinlösung wurden in mit H₂O_{bidest} gewaschene, neue Glasröhrchen (0,6 x 10 cm; Schott, Mainz) gebracht und zur Trockne mit Stickstoff abgeblasen. Zu der getrockneten Probe wurden 500 µl 6 N HCl (Pierce) gegeben und das Glasröhrchen unter Vakuum zugeschmolzen. Die so behandelten Proben wurden 20 h im Trockenschrank bei 110°C inkubiert. Anschließend konnte das abgekühlte Hydrolysat nach vorsichtigem Aufbrechen des Glashalses zur Trockne mit Stickstoff abgeblasen und in 500 µl Probenpuffer aufgenommen werden.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Probenpuffer:	19,6 g Na-citrat
	20 ml Thiodiglycol
	1 ml Phenol
	mit HCl auf pH 2,2 eingestellt
Puffer A:	100 ml Pico-Puffer A (Fa. Kontron, Eching)
	10 ml n-Propanol
Puffer B:	19,6 g Na-citrat, pH 3,6
	29,2 g NaCl
	1 ml Phenol
Puffer C:	19,6 g Na-Citrat, pH 4,1
	82 g NaCl
	1 ml Phenol

Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter wässrigen Puffers.

200 µl der hydrolysierten Probe wurden durch einen automatischen Probengeber auf die Säule (Dowex A 6) des Aminosäureanalysators (Liquimat III, Kontron) appliziert. Die Elution der Aminosäuren erfolgte durch das sequentielle Waschen des Kationenaustauschers mit den Puffern A,B und C und steigende Temperatur der Säule (44-80°C). Durch Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin konnten die Aminosäuren bei 570 nm, bzw 440 nm für Prolin, detektiert und mittels eines Integrators (Shimadzu) und einer Standardaminosäurelösung (Hamilton-Standard, Sigma) quantifiziert werden. Ein Trennlauf plus anschließende Regeneration der Säule dauerte 2,5 Stunden. Die Nachweisgrenze der Aminosäuren lag bei etwa 0,1 nMol. Für die Analyse von Phytochelatin bot sich parallel behandeltes Glutathion als Referenz an.

5.3. Bestimmung der Stereokonfiguration

Die Stereokonfiguration von Aminosäuren wird im allgemeinen enzymatisch bestimmt. Dabei macht man sich die Stereoselektivität mancher Enzyme zu Nutze, die nur L- oder D-Aminosäuren umsetzen. Häufig werden L- oder D-Aminosäureoxidasen für diesen Zweck eingesetzt. Jedoch akzeptieren diese Enzyme saure Aminosäuren nicht oder sehr schlecht als Substrat. Deshalb wurde für die Untersuchung der Stereokonfiguration der Glutaminsäure eine L-spezifische Decarboxylase verwendet.

L-Glutaminsäuredecarboxylase:

Hydrolysiertes Glutathion bzw. Phytochelatin (etwa 150 nMol) wurden pro Ansatz eingesetzt. Als Kontrollen dienten gleiche Molmengen an L- und D-Glutaminsäure (Glu), (Sigma).

Ansatz nach Bergmeyer (1974):

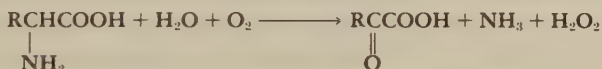
20 µl Hydrolysat, L-Glu oder D-Glu (150 nMol)

100 µl Natriumacetatpuffer, 0,1 M, pH 4,5
0,2 mg Enzym aus E. coli, 4,3 units/ mg (Sigma)

Die Proben inkubierten bei 37°C für 2 Stunden. Aliquote Teile des Ansatzes wurden mit Probenpuffer (B 5.2.) versetzt und durch Aminosäureanalyse untersucht.

L-Aminosäureoxidase:

Zur Bestimmung der Stereokonfiguration von Cystein aus Phytochelatin wurde eine L-Aminosäureoxidase aus Schlangengift verwendet. Die Oxidase katalysiert folgende Reaktion (Wellner 1971):



Vor allem hydrophobe Aminosäuren werden nach diesem Schema umgesetzt. Da Cystein und Cystin in der sauren Hydrolyse praktisch vollständig zerstört werden, wurde das S-benzylierte Derivat eingesetzt. S-benzyliertes Cystein wurde durch Hydrolyse von entsprechend modifiziertem Phytochelatin mit einer Ausbeute von etwa 25% erhalten. Zur Bestimmung der Stereokonfiguration von S-benzyliertem Cystein wurde das Phytochelatinhydrolysat verwendet.

Ansatz:

20 µl Aminosäurelösung (30 - 40 nMol)
200 µl Tris-Cl Puffer, 0,2 M, pH 7,2
0,1 unit L-Aminosäureoxidase (aus Schlange, Sigma)
ad 300 µl H₂O

Während der 1-stündigen Inkubation perlte Preßluft durch den Ansatz. Die quantitative Auswertung der Desaminierung von Cystein erfolgte wieder über Aminosäureanalyse.

6. Proteinsequenzierung

6.1. Aminoterminal Aminosäuren

6.1.1. Dinitrophenylierung

Sanger-Reagens, Dinitrofluorbenzol (DNFB), reagiert selektiv und in hydrolysestabiler Weise mit Aminogruppen. Die aminoterminal Aminosäure kann nach Hydrolyse als gelbes Dinitrophenyl-Derivat nachgewiesen werden. Da die Derivate lichtempfindlich sind, wurden nachstehende Schritte in vor Lichteinfall geschützten Gefäßen ausgeführt.

200 µl Ansatz: 1 mg Perameisensäure oxidiertes Peptid
180 µl Puffer H₂O:Ethanol:Triethylamin
im Verhältnis 50:50:10
20 µl 1,5% ethanolische DNFB-Lösung
60°C, 30 min

Nach Ablauf der Reaktion wurde die Probe mit gereinigter Preßluft zur Trockne abgeblasen, erneut in Puffer aufgenommen und wie oben mit Reagens und Puffer versetzt. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt und der Ansatz getrocknet. Die getrocknete Probe wurde, soweit möglich, in 200 µl H₂O gelöst. Durch mehrmaliges Ausschütteln mit Wasser gesättigtem Ether ließ sich überschüssiges Reagens extrahieren. Anschließend wurde die Probe in 6n HCl hydrolysiert (siehe 4.3). Das getrocknete Hydrolysat wurde in 10 µl Ethanol gelöst und mit DNP-Aminosäuren (Sigma) als Referenz auf Kieselgelplatten (Sil G UV 254, Fa. Merck) in n-Propanol: 34% Ammoniak, 70:30 (Brenner et al. 1961) chromatographiert.

6.1.2. γ-Glutamyltranspeptidase

Diese Peptidase spaltet spezifisch aminoterminal Glu-

taminsäurereste von Peptiden ab, die über die γ -Carboxy-Gruppe peptidisch verknüpft sind (Connell und Adamson 1979). Die Aminosäure kann entweder in einer Transpeptidasereaktion auf geeignete Akzeptormoleküle wie Cystein, Diglycin oder Glutathion übertragen oder freigesetzt werden. Durch die Wahl des pH-Wertes und des Akzeptors läßt sich die eine oder andere Reaktion unterdrücken. Die verwendete, hochgereinigte Enzympräparation aus Rinderniere (Serva, Heidelberg; reinst) zeigte eine selektive, peptidolytische Aktivität unter niedrigen Salzkonzentrationen (< 50 mM) und in Abwesenheit von freien, divalenten Kationen. Deshalb wurden Spuren von zweiwertigen Kationen durch 5 mM EDTA im Ansatz komplexiert.

Ansatz, 20 μ l:

10 nMol S-benzyliertes Peptid

5 mM EDTA pH 8,0

0,1 unit Enzym

pH 7,5 mit 0,01 N NaOH bzw. HCl eingestellt

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für eine halbe Stunde. Durch Zugabe von 2 Volumenteilen Ethanol wurde die Reaktion beendet und die abgespaltene Glutaminsäure über Aminosäureanalysator quantifiziert.

Der Umsatz lag zwischen 95-100%.

6.2. Carboxyterminale Aminosäuren

6.2.1. Hydrazinolyse

Die Umsetzung von Protein mit Hydrazin führt zur Spaltung der Peptidbindungen im Molekül. Dabei werden alle Aminosäuren bis auf die carboxyterminale in die entsprechenden Hydrazide überführt. Die freie C-terminale Aminosäure kann anschließend über Aminosäureanalyse bestimmt

werden. Die Hydrazide der Aminosäuren eluieren durch die basische Modifizierung sehr viel später von der Ionentauschersäule des Aminosäureanalysators, so daß sie die Identifizierung der freien Aminosäuren nicht beeinträchtigen.

Ansatz: 50 µg Peptid (trocken!)
 300 µl Hydrazin

Der Ansatz wurde in Violaxröhrchen (Fa. Schott, Mainz) eingeschmolzen und zwei Tage bei 80°C inkubiert. Überschüssiges Hydrazin wurde unter Eiskühlung mit Aceton umgesetzt und die Probe im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Hydrolysat wurde in Probenpuffer aufgenommen und mit Hilfe des Aminosäureanalysators untersucht.

6.2.2. Carboxypeptidase

Zur Bestimmung des Carboxyterminus können auch Carboxypeptidasen eingesetzt werden, die jeweils die C-terminale Aminosäure eines Proteins abspalten. Die einzelnen Aminosäuren werden durch Carboxypeptidasen nicht gleich gut hydrolysiert. Vielfach wird Glycin von den Carboxypeptidasen schlecht oder nicht abgespalten. Für nachstehenden Versuch wurde Carboxypeptidase Y aus Hefe verwendet, die vergleichsweise viele Aminosäuren als Substrat akzeptiert (Hayashi 1976). Zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäure wurde die Kinetik der Hydrolyse verfolgt.

Ansatz:

 100 µMol Peptid
 900 µl Puffer, 0,05 M Natriumphosphat, pH 6,5
 1 unit Enzymlösung (Sigma)
 ad 1 ml H₂O
25°C, 0 - 120 min (in 30 minütigen Abständen wurden ali-

quote Teile des Ansatzes auf freie Aminosäuren analysiert).

6.3. Enzymatisch-chemischer Abbau

Die Sequenzierung konnte durch eine Abfolge von enzymatischen Schritten mit γ -Glutamyltranspeptidase und einem modifizierten Edmanabbau durchgeführt werden.

6.3.1. Abspaltung des γ -Glutamylrestes

Über die γ -Carboxygruppe peptidisch gebundene Glutaminsäure wurde wie unter B 6.1.2. beschrieben abgespalten. Allerdings befand sich im Ansatz (100 μ l) für die Sequenzierung 100–300 nMol S-benzyliertes Peptid und entsprechend mehr Enzym (1–3 units, 10 units/mg) mußte eingesetzt werden. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz für 15 Minuten auf 95°C gebracht und präzipitiertes Proteinmaterial durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde für die weitere Sequenzierung durch einen modifizierten Edmanabbau verwendet.

6.3.2. Modifizierter Edmanabbau

Ein manueller Edmanabbau ist von Chang et al. (1978, Chang 1983) beschrieben. Der wesentliche Unterschied zum Edmanabbau liegt im Kopplungsreagens, das in dieser modifizierten Methode durch ein Derivat des Isothiocyanats – 4-Dimethylaminoazobenzol-4-isothiocyanat (DABITC) – ersetzt wurde.

Der Vorteil liegt in einer noch höheren Nachweisempfindlichkeit und in der leichten Identifizierung der Thiohydantoinderivate der abgespaltenen Aminosäuren, die im Sauren als roter Chromophor vorliegen. Die Bestimmung der Aminosäurederivate erfolgt nach 2-dimensionaler Mikro-Dünnschichtchromatographie (2,5 x 2,5 cm), die

knapp 10 Minuten in Anspruch nimmt.

Verwendete Reagentien:

Pyridin (LKB, Nr. 4320218)

DABITC (Fluka, Nr. 39065)

Phenylisothiocyanat (Pierce, Nr. 26922)

Trifluoressigsäure (Pierce, Nr. 28901; über CaCl_2
(10 g/ 1 Säure) Spuren von Wasser entfernt

Eisessig (Merck) gesättigt mit HCl durch Einleiten
von HCl-Gas für 2 Stunden

n-Heptan/ Ethylacetat, 2:1 (Roth); zusätzlich
destilliert

Butylacetat (Roth)

H_2O , 4x destilliert

Der Abbau wurde in dickwandigen Glasgefäßen (0,6 x 10 cm) mit fest schließenden Kunststoffstopfen unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Etwaige Staubpartikel in den mit H_2O gewaschenen Glasröhrchen wurden durch Trockenveraschung (400°C, über Nacht) beseitigt. Vor Gebrauch wurde aus einer DABITC enthaltenden Acetonstamm-lösung (28,2 mg DABITC/ 10 ml Aceton) die benötigte Menge entnommen, im Exsikkator getrocknet und mit Pyridin auf das anfängliche Volumen eingestellt.

Ansatz:

10 nMol (maximal) Probe, im Gläschen getrocknet

40 μl H_2O

40 μl DABITC in Pyridin

40 μl Pyridin

Der Ansatz wurde gemischt und unter Stickstoffbegasung verschlossen. Anschließend folgte für 50 Minuten die Phase der Kopplungsreaktion durch Inkubation der Probe in einem Heizblock von 52°C. Nach Zugabe von 10 μl Phenylisothiocyanat zum Ansatz wurde die Inkubation weitere 30 Minuten fortgesetzt. Im Anschluß daran konnte

überschüssiges Reagens durch mehrmaliges Ausschütteln (5-6 mal) mit 500 µl Heptan/Ethylacetat und Absaugen der organischen Phase nach Zentrifugation (5000 x g, 5 min) extrahiert werden. Die wässrige Phase im Gläschen wurde im Exsikkator mit angelegtem Vakuum über Kieselgel und NaOH getrocknet (40 min).

Die nächsten Schritte umfassen die Abspaltung und Konvertierung des Thiazolinonderivats der abgespaltenen Aminosäure in das entsprechende Thiohydantoin. Die getrocknete Probe wurde mit 50 µl Trifluoressigsäure vermischt und erneut unter Stickstoff bei 52°C 15 Minuten inkubiert, anschließend wie zuvor getrocknet (ca. 30 min). Nach Lösen in 50 µl H₂O konnte die abgespaltene Aminosäure mit 200 µl Butylacetat extrahiert und in einem separaten Gläschen getrocknet werden. (Die wässrige Phase enthielt das Restpeptid und stand nach Trocknung für einen erneuten Abbauzyklus zur Verfügung. Daran schloß sich die Umwandlung des Derivats zum Thiohydantoin an. Das geschah durch 50 minütige Inkubation der abgespaltenen Aminosäure in 60 µl HCl gesättigtem Eisessig : H₂O (2:1) unter Stickstoff bei 52°C. Das getrocknete Produkt wurde zur Identifizierung der Aminosäure eingesetzt.

Das Thiohydantoin der Aminosäure wurde in etwa 0,5 µl Ethanol gelöst und mittels einer Glaskapillare (Pederson, Holland) ein Teil davon auf ein 2,5x2,5 cm großes Dünnschichtplättchen (Schleicher und Schüll, Polyamid F 1700 Nr. 356 000) aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte zweidimensional mit den Laufmitteln: 1. Dimension Essigsäure : H₂O, 1 : 2 (Laufzeit 4-5 min); 2. Dimension Toluol : Essigsäure : n-Hexan, 2 : 1: 1 (Laufzeit 2-3 min).

Nach dem Trocknen des Chromatogramms konnte die abgespaltene Aminosäure durch kurzzeitiges Ansäuern mit HCl-Gas als kirschroter Fleck sichtbar gemacht werden. Zur leichteren Identifizierung waren auf der Rückseite des

Plättchens, exakt an der gegenüberliegenden Stelle des

20 DABITC-derivatisierte Standardaminosäuren aufgetrennt durch zweidimensionale Chromatographie auf 6 cm² Polyamid-Dünnschicht, entnommen aus Chang (1983). Die Aminosäuren sind mit dem Einbuchstabensymbol nach IUPAC-IUB (1966, 1969) gekennzeichnet (siehe auch: Abkürzungen)



Probenauftrags, Standardaminosäuren aufgetüpfelt worden. Im Durchlicht ließ sich die unbekannte Probe unschwer einer deckungsgleichen Standardaminosäure zuordnen.

6.4. Partialhydrolyse

Durch partielle, saure Hydrolyse von dinitrophenyliertem Peptid (DNP-Peptid) wurden die einzelnen Peptidbindungen zufällig gespalten und dadurch ein Gemisch aller möglichen Peptidfragmente erzeugt. Bruchstücke mit intaktem Aminoterminus waren durch die gelbe Dinitrophenyl-Gruppe zu erkennen. Die Trennung der DNP-Fragmente und ihre Aminosäureanalyse ermöglichten, nach Quantifizierung der isolierten Peptidbruchstücke über die DNP-Gruppe, die Ermittlung der Primärstruktur.

6.4.1. Peptidmodifikation und limitierte Säurehydrolyse

Salzfreies, perameisensäureoxidiertes Peptidmaterial wurde, wie in B 6.1.1. beschrieben, mit Sanger-Reagens dinitrophenyliert. Die Partialhydrolyse des getrockneten Peptidderivats, z.B. 1 mg, erfolgte in 100 µl 1 N HCl

bei 95°C. Nach 18 minütiger Hydrolyse wurde die Probe abgekühlt, getrocknet und in 10 µl 50% ethanolischer Lösung aufgenommen.

6.4.2. Zweidimensionale Trennung der Peptidfragmente

Die partialhydrolysierten Peptide ließen sich auf Dünnschichtplatte durch Elektrophorese und anschließende Chromatographie trennen.

Dazu wurde das Hydrolysat möglichst punktförmig auf eine Kieselgelplatte (Kieselgel 60 F, 20x20 cm, Merck) appliziert. Das Dünnschichtmaterial war zuvor mit Laufpuffer, H₂O:Ameisensäure:Eisessig, 854:26:120, bis zur Durchfeuchtung angesprüht worden. Die Trennung erfolgte durch Horizontalelektrophorese mit dem zuvor erwähnten Puffer bei 20 Volt/ cm und unter Wasserkühlung. Der Elektrodenpuffer besitzt einen pH-Wert von etwa 2, sodaß die Carboxylgruppen der Moleküle weitgehend undissoziiert vorliegen und damit kaum vom elektrischen Feld beeinflußt werden. Dagegen ziehen die Sulfonsäuregruppen der modifizierten Cysteine die Peptide in Richtung Anode, wobei die Mobilität der Fragmente durch die Anzahl solcher Gruppen und die Kettenlänge bestimmt wird. Nach einstündiger Elektrophorese wurde das Kieselgel trocken-gefönt, und mit einem alkalischen Laufmittel (n-Propanol: 30% Ammoniak : Wasser, 50:15:10) in der 2. Dimension chromatographiert.

Die DNP-Peptide konnten als gelbe Flecken lokalisiert und von der Platte geschabt werden. Über Minisäulchen (kleine Kunststoffpipettenspitzen unten mit Glaswolle verschlossen) wurde das gelbe Material mit 50% ethanolischer Lösung eluiert. Nach Bestimmung der relativen Konzentration der DNP-Gruppen durch Messung der Extinktion bei 360 nm wurden die DNP-Peptide totalhydrolysiert und deren Aminosäuregehalt quantitativ analysiert. Um eine Photolyse der dinitrophenylierten Peptide (siehe

B 6.1.1.) zu vermeiden, wurden die oben genannten Prozeduren vor Licht geschützt durchgeführt.

7. Phytochelatinschnelltest

Für die zuverlässige Messung der Induktion von Phytochelatinen war es notwendig, einen spezifischen, schnell durchzuführenden und quantitativen Nachweis für diese Peptide zu besitzen. Dies gelang durch die Kombination von Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Nachsäulenderivatisierung und einen alkalischen Zellaufschluß unter reduzierenden Bedingungen.

7.1. Analytik

Die unter B 4.6. beschriebene analytische HPLC-Methodik wurde übernommen und durch eine Nachsäulenderivatisierung mit Ellman-Reagens ergänzt, d.h. eine zusätzliche HPLC-Pumpe mischte die Reagenslösung (75 μ M Ellman-Reagens in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,6; Fluß: 2 ml/min) mit dem Eluat der Trennsäule über ein T-Stück. Durch eine danach angeordnete 5 ml Probenschleife konnte das Gemisch etwa 75 Sekunden reagieren bis zur Absorptionsmessung bei 410 nm in einem Durchflußphotometer. Das Chromatogramm wurde synchron über einen Integrator (Spectra-Physics) aufgezeichnet und Fraktionsflächen berechnet. Der 'response'-Faktor für die einzelnen Phytochelatine wurde ermittelt und in Relation zu Glutathion gesetzt, das zum Kalibrieren der Chromatogramme diente.

7.2. Zellaufschluß

Um eine Aussage über den zellulären Gehalt an Glutathion und Phytochelatin treffen zu können, mußte der Zellauf-

schluß vollständig sein und eine Oxidation der SH-Gruppen von Phytochelatin verhindern. Deshalb wurden frisch geerntete Pflanzensuspensionszellen bzw. mit flüssigem Stickstoff schockgefrorenes und anschließend gemahlenes Gewebe differenzierter Pflanzen (0,4 g) in einem Eppendorfreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) mit 0,4 ml 1 N NaOH versetzt, die 1 mg NaBH_4 / ml enthielt. Nach Ultraschallung (Branson, USA; 3 x 5 sec mit 35 kHz) wurde der Aufschluß 5 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand (0,4 ml) wurde in ein neues Gefäß transferiert und mit 100 μl 3,6 N HCl angesäuert. Im Anschluß an eine 30 minütige Präzipitation konnte ausgefallenes Material durch erneutes Zentrifugieren entfernt werden. 50 - 200 μl des weitgehend entproteinisierten Aufschlusses wurden auf die HPLC-Säule appliziert.

Der Aufschluß der Hefezellen erfolgte in analoger Weise. Pilzzellen aus 1,5 oder 3 ml Kultur wurden durch kurzzeitiges Zentrifugieren sedimentiert und in 0,4 ml H_2O suspendiert. Durch Zugabe von 100 μl 2,5 N NaOH mit 1 mg/ ml NaBH_4 lysierten die Zellen, die beschallt und weiterbehandelt wurden wie zuvor für Pflanzenzellen ausgeführt.

C ERGEBNISSE

1. Nachweis eines induzierbaren, Cadmium-bindenden Peptidmaterials

Durch Vorversuche sollte der Nachweis eines Cd-bindenden Proteins in Zellkulturen erbracht werden. Um solch ein Protein nachzuweisen, empfahl sich entweder radioaktives Cd einzusetzen oder, wenn genügend Schwermetall von den Zellen aufgenommen und spezifisch cheliert wurde, der Metallsnachweis durch Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) mit einer Empfindlichkeit von 10 ng Cd/ml. Zuerst mußten aber die Konditionen der Cd-Belastung erarbeitet werden, um unter optimierten Bedingungen die Verteilung des Schwermetalls in der Zelle gut verfolgen zu können.

1.1. Wachstumshemmung durch Cadmium

Da Cd-Ionen weitgehend unspezifisch von der Pflanze, in Konkurrenz mit anderen divalenten Kationen wie Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} aufgenommen werden (Cataldo et al. 1983), ist eine effektive Absorption des Schwermetalls bei hohen, jedoch subletalen Konzentrationen zu erwarten. Toxische Effekte von Schwermetallen führen bei Pflanzen u.a. zu Wachstumsinhibierung, die deshalb als Maß für die Schwermetallbelastung herangezogen werden kann. Unter den einzelnen Pflanzenarten gibt es deutliche Unterschiede in der Cd-Toleranz. So wurde bei Sojabohnen bereits durch 1 μM Cd und bei Gerste erst durch eine 40-fach höhere Cd-Konzentration eine 50% Wachstumshemmung gegenüber unbelasteten Kontrollpflanzen festgestellt (Page et al. 1972). Ein vergleichbarer Konzentrationsbereich (5-90 μM Cd^{2+}) wurde auch zur Belastung von differenzierten Pflanzen verwendet, aus denen Cd-

bindende Proteine nach mehrwöchiger Exposition isoliert werden konnten (Weigel und Jäger, 1980; Bartolf et al., 1980; Wagner und Trotter, 1982). Für pflanzliche Zellsuspensionskulturen lagen keine Zahlen vor, deshalb wurde die Wachstumshemmung der Kulturen von Rauvolfia serpentina und Rosa canina in Abhängigkeit von der Cd-Konzentration untersucht (Abb. 4 und 5).

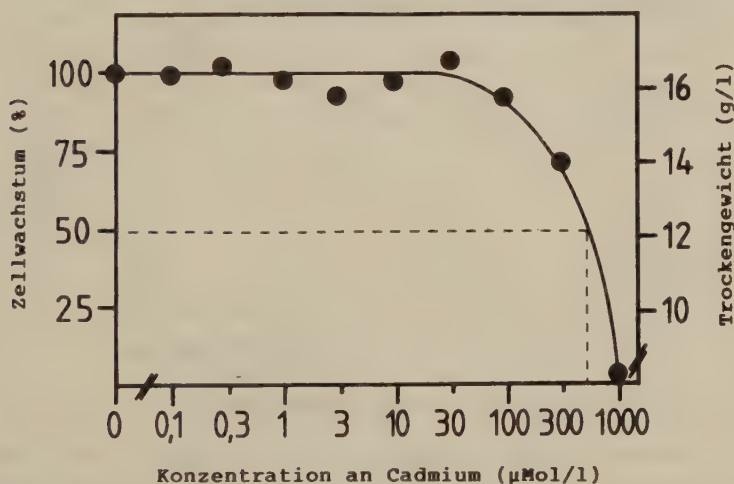


Abb. 4: Wachstumshemmung von Rauvolfia serpentina durch Cadmium
 Suspensionskulturen von R. serpentina (je 100 ml) wurden 4 Tage nach Inokulation mit steigenden Konzentrationen an Cd belastet und der Zellzuwachs während der viertägigen Schwermetallexposition bestimmt. Zum Zeitpunkt der Schwermetallzugabe betrug die Zelldichte der Kulturen 8,1 g TG/l, zum Zeitpunkt der Ernte wurde für die unbelastete Kontrollkultur ein Trockengewicht von 16,4 g/l bestimmt.

Die Untersuchungen über einen Konzentrationsbereich von 10^{-7} - 10^{-3} M Cd belegen, daß beide Suspensionskulturen eine viertägige 100-200 µM Cd-Belastung noch ohne oder nur mit geringer Beeinträchtigung des Zellwachstums

tolerieren. Eine etwa 50 % Wachstumshemmung konnte erst bei 400-500 μM Cd beobachtet werden. Um eine zu starke Intoxikation der Zellen zu vermeiden, wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen Zellkulturen 100-300 μM Cd exponiert.

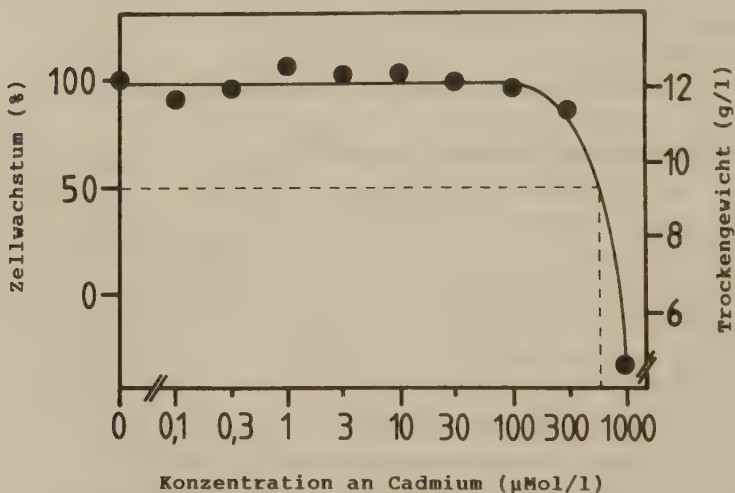


Abb. 5: Wachstumshemmung von Rosa canina durch Cadmium

Der Versuch wurde wie zuvor durchgeführt (Abb. 4). Die Cd-Belastung der Kulturen erfolgte bei einer Zelldichte von 6,5 g TG/l. 100% Wachstum entsprach einem Trockengewicht von 12,2 g/l der Zellsuspensionskulturen.

1.2 Aufnahme von Cadmium und Verteilung in der Zelle

Schwermetalle akkumulieren im pflanzlichen Gewebe, wie aus Metallanalysen von Pflanzenmaterial über eine Vegetationsperiode hinweg hervorgeht. In Silene cucubalus konnte ein 10 facher Konzentrationsanstieg an Zinkionen in der Pflanze zwischen Austrieb und Samenreife beobachtet werden (Ernst 1974). Inwieweit eine kurzzeitige Cd-Exposition zu einer Aufnahme und Anreicherung des

Schwermetalls in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen führt, wurde an R. canina nach fünftägiger 100 μM Cd-Belastung untersucht und gleichzeitig eine erste Fraktionierung der Zellbestandteile vorgenommen (Tab. 1). Mit den Pflanzenzellen war nahezu das gesamte applizierte Cd assoziiert (98%). Nach Aufschluß und Zentrifugation des Gewebes konnte der überwiegende Teil (74%) des applizierten Schwermetalls im zellfreien Extrakt nachgewiesen werden und im geringen Maße (10%) im partikulären Sediment, wahrscheinlich an Zellwände adsorbiert bzw. in intakten Zellen. Vergleichbar viel (10%) war mit Ca^{2+} austauschbar extern gebunden und konnte durch Waschen der intakten Zellen mit 0,1 M CaCl_2 -Lösung entfernt werden.

	Cd-Gehalt (μg)	Wiederfindung (%)	Zellassoziiertes Cd (%)
Cd eingesetzt	1124	100	--
Medium	20	1,8	--
Ca^{2+} austauschbar	107	9,5	10,2
Extrakt	829	73,7	78,9
Sediment	115	10,2	10,9
Summe	1071	95,2	100,0

Tab.1: Aufnahme und Verteilung von Cadmium in Rosa canina
100ml Zellsuspensionskultur wurden 4 Tage nach Inokulation (4,6g Tg/l) mit 100 μM CdCl_2 für 6 Tage belastet. Anschließend wurde das Gewebe mit 0,1 M CaCl_2 -Lösung gewaschen und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Zugabe von 2 Volumenteilen Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,6) zu den Zellen wurde das Homogenat durch Zentrifugation (9000xg, 30 min) in Extrakt und Sediment getrennt. Der Cd-Gehalt wurde im Medium, in der zum Waschen verwendeten Ca-Lösung und in den beiden Fraktionen bestimmt.

Weitere Fraktionierung des zellfreien Extraktes durch Hitzedenaturierung und DEAE-Ionenaustaushromatographie zeigte eine Komplexierung des Cd an hitzestabile, anionische Moleküle (Tab. 2).

	Protein (mg)	Cadmium (µg)	Spez. Cd- gehalt(µg Cd/mg Prot)	Anreich- erung	Wiederfin- dungsrate von Cd (%)
Zellfreier Extrakt	11,9	682	57,3	1	100
Sediment- Hitzeschritt	5,9	9	1,5	0,03	1,3
DEAE-Nieder- salzeluat	2,4	0	0	0	0
DEAE-Hoch- salzeluat	2,6	675	259,6	4,5	98,9
Summe	10,9	684	---	---	100,2

Tab. 2: Fraktionierung des zellfreien Extraktes von Cd belasteter R. canina

40 ml des in Tab. 1 beschriebenen Rohextraktes wurde erhitzt (60°C, 5 min), in Eis abgekühlt und präzipitiertes Material abentrifugiert (9000xg, 15 min). Der Überstand wurde mit 2 Volumen Wasser verdünnt, auf pH 8,6 eingestellt und auf einer DEAE-Säule (1x10 cm) aufgetragen. Dann wurde die Säule mit Puffer, 10 mM Tris-Cl pH 8,6, gewaschen (Niedersalzeluat). Der bereits zum Äquilibrieren der Säule dienende, gebundenes Protein konnte mit diesem Puffer plus 0,5 M NaCl eluiert werden (Hochsalzfraktion). Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976).

1.3. Induktion eines Cd-bindenden Peptidmaterials durch Cadmium

Um eine Vorstellung von der molekularen Größe der Cd-komplexierenden Substanzen zu erhalten, wurde eine Gel-filtration des Extraktes mit einem Säulenmaterial durchgeführt, das im Molekulargewichtsbereich von 1,5-30 kDa Proteine bzw. Peptide trennt. Durch eine vergleichende Analyse von Extrakten unbelasteter Zellen, denen das Schwermetall nach Aufschluß zugesetzt worden war, und Cd belasteter Zellen wurde versucht, die Frage nach einer spezifischen und induzierbaren Schwermetallchelierung zu beantworten.

Extrakte von R. serpentina wurden durch Sephadex G-50 Chromatographie mit kontinuierlicher Extinktionsbestimmung des Eluates bei 254 nm fraktioniert, eine Linie, auf der Cd-Thiolate gut absorbieren. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Cd-Gehalt und SH-Konzentration getestet (Abb. 6).

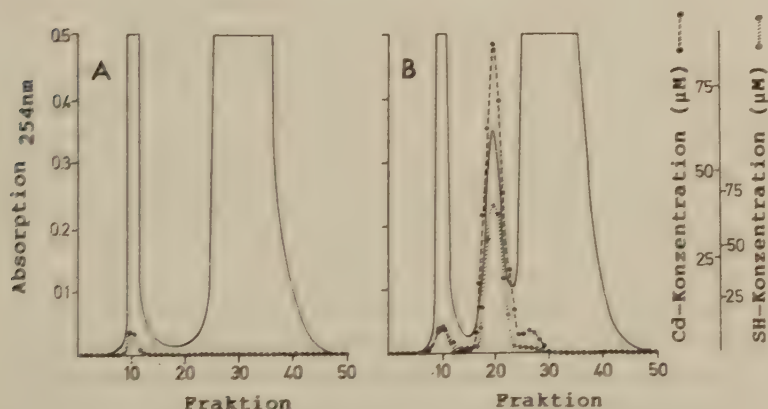


Abb. 6: Elutionsprofile von Rohextrakten aus R. serpentina Suspensionskulturen (A) ohne und (B) mit Cadmium belastet.

6 Tage alte Kulturen wurden nach Zugabe von $200\mu\text{M CdSO}_4$ in Ansatz (B) weitere 4 Tage kultiviert. Nach Aufschluß der geernteten Gewebe, wie in Tab. 1 beschrieben, wurde der Extrakt durch Lyophilisieren konzentriert und davon 5 ml mit 20 mg Protein auf eine Sephadex G-50 Säule aufgetragen. Mit 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl Puffer, pH 8,0, und einer Flußrate von 73 ml/ h (10 Fraktionen/ h) erfolgte die Chromatographie. Der applizierte Extrakt nicht exponierter Zellen enthielt $380\mu\text{g}$ nachträglich zugesetztes CdSO_4 .

Zum Rohextrakt des Kontrollgewebes (Abb. 6A) wurde eine den exponierten Zellen annähernd gleiche Menge $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ zugegeben. Das zellfreie Homogenat der Kontrolle konnte in ein hochmolekulares Material ($>20\text{ kDa}$, Fraktionen 9-11) mit etwa 3% des gesamten applizierten Cd und in eine niedermolekulare Fraktion ($\leq 1\text{ kDa}$, Fraktionen 26-34) getrennt werden. Letztere enthielt knapp 50% des Cd, etwa gleich viel, wie als freie Ionen vorlagen (Fraktionen 42-48).

Im Extrakt der belasteten Zellen (Abb. 6B) war mehr als 90% des Cd in einer neuen, intermediären Fraktion (Fraktionen 16-24) mit einem Molekulargewicht von grob 3-4 kDa zu finden. Mit dem hoch- und niedermolekularen Material assoziiert konnte nur wenig Cd nachgewiesen werden. Die SH-Bestimmung aller Fraktionen zeigte, daß nur jene neue, Cd-haltige Fraktion erhebliche Mengen an reduziertem Schwefel besaß. Aus diesen Befunden wurde auf eine Neusynthese der Cd-bindenden Substanz unter Schwermetallbelastung der Zellen geschlossen.

Zur Verifizierung einer Induktion von SH-haltigem Material in pflanzlichen Zellkulturen nach Cd-Exposition und, um einen Einblick in den zeitlichen Verlauf der Biosynthese zu gewinnen, wurden R. canina Zellen mit $200\mu\text{M Cd}^{2+}$ belastet und über mehrere Tage der Cd- und SH-Gehalt des zellfreien Extraktes im Vergleich zu unbel-

steten Zellen beobachtet (Abb. 7).

Sofort nach Cd-Zugabe konnte eine drastische Zunahme der zellulären SH-Konzentration festgestellt werden, die von einer parallelen Cd-Aufnahme begleitet war (Abb. 7A). Bereits nach zweitägiger Schwermetallexposition wiesen induzierte Zellen einen 6-7 fach höheren SH-Gehalt auf als die Kontrolle. Es handelt sich hierbei um die beachtliche Syntheseleistung von ca. 40 μMol SH-Gruppen pro Gramm Trockensubstanz, die nicht auf eine einfache Reduktion zellulärer Disulfidbrücken zurückzuführen ist,

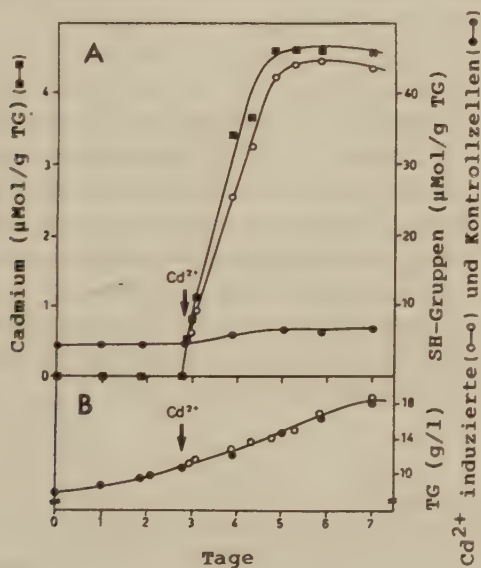


Abb. 7: Induktion von sulfhydrylhaltigem Material in *Rauvolfia serpentina* Zellsuspensionskulturen (A) und Wachstum der Zellen (B) während $200 \mu\text{M}$ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -Belastung. Der Cd-Gehalt wurde nur von der DEAE-bindenden Fraktion des Zellextraktes bestimmt. Die Werte wurden durch Abziehen der unspezifischen Cd-Bindung von Kontrollzellen, denen Cd während der Aufarbeitung zugesetzt worden war, korrigiert.

da mehr als 90% des organischen Schwefels der Pflanzenzelle in der reduzierten Form vorliegt (Rennenberg 1982). Nach 2 Tagen verlangsamte sich deutlich die Neubildung von Sulfhydrylgruppen in der Zellkultur. Während der zelluläre SH-Gehalt konstant blieb, nahm der Gesamtgehalt an reduziertem Schwefel in der Kultur durch fortlaufende Zellteilung und Wachstum noch etwas zu (Abb. 7B). Aus diesem Experiment war eine klare Induktion SH-haltigen Materials zu ersehen, dessen Neusynthese vor allem in den ersten zwei Tagen der Cd-Exposition stattfindet, mit einem maximalen SH-Gehalt pro Liter Pflanzensuspensionskultur nach etwa vier Tagen.

Fazit:

Die Vorversuche lassen erkennen, daß die verwendeten Zellsuspensionskulturen mit 3-10 fach höheren Cd-Konzentrationen im Vergleich zu differenzierten Pflanzen belastet werden können und sie das angebotene Schwermetall in wenigen Tagen zu akkumulieren vermögen. Das von der Zelle aufgenommene Cd ist fast ausschließlich an eine stark induzierbare, anionische und SH-haltige Substanz, wahrscheinlich ein Peptidmaterial, mit einem Molekulargewicht von ca. 3-4 kDa gebunden.

2. Isolierung von Phytochelatin

Die unter C 1. erwähnten Experimente enthalten bereits Ansätze zur Isolierung der Cd-bindenden Substanz durch Hitzedenaturierung, DEAE-Säulenchromatographie und Gel-filtration. Ein weiterer Reinigungsschritt konnte durch eine Ammonsulfatfraktionierung gefunden werden. Denn Versuche, den Metallkomplex in 25% gesättigter Ammonsulfatlösung (pH 6) auszusalzen, führten zu einer nahezu quantitativen Proteinfällung, während das SM-haltige Material nicht präzipitierte. Dieses ungewöhnliche Verhalten, Zeichen einer stark hydrophilen Substanz, konnte zu einer hohen Anreicherung genutzt werden.

Anhand der Ergebnisse ließ sich folgende Proteinreinigung ausarbeiten: Aufschluß der Zellen, Chromatographie und Konzentrierung der Proteine an DEAE-Ionentauscher, Präzipitation kontaminierender Proteine mit Ammonsulfat, Entsalzen und Konzentrierung des Überstandes mittels Ultrafiltration, Sephadex G-50 Gelfiltration mit einem flüchtigen Puffer und zuletzt Lyophilisieren der Cd- und SH-haltigen Fraktion. Einzelheiten der Reinigung sind dem Kapitel B 3. zu entnehmen. Zuweilen wurde das Lyophilisat zusätzlich über eine Sephadex G-25 oder G-10 Säule entsalzt.

Der isolierte Cd-Komplex wird als **Phytochelatin** bezeichnet und mit PC abgekürzt. Die Silbe 'Phyto'- soll dem Vorkommen des Cd-bindenden Peptidmaterials in der Pflanze Rechnung tragen, und '-chelatin' wurde aufgrund der Metall-chelierenden Eigenschaft der Substanz gewählt.

Eine typische Anreicherung von Phytochelatin ist aus der Tab. 3 zu ersehen: Mit einem bemerkenswerten Ergebnis. Phytochelatin ließ sich nicht als Protein mit der Bestimmungsmethode von Bradford (1976) nachweisen. Zu

einem gleichen Befund führten Versuche, das Cd bindende Material nach einer Vorschrift von Lowry et al. (1951) zu erfassen. Jedoch konnten Zweifel am Peptidcharakter von PC durch eine Aminosäureanalyse beseitigt werden (siehe C 4).

	Volumen (ml)	Protein ^a (mg)	Cadmium (mg)	Ausbeute (%Cd)	rel. Protein- gehalt (%)
Gewebe ^b	280	---	21,4	---	---
Rohextrakt	330	225	18,6	100	100
DEAE-Eluat	18,0	91,2	17,6	95	41
Salzfällung	21,8	1,72	16,4	88	0,8
Ultrafiltr.	6,1	1,07	14,0	75	0,5
Gelfiltrat.	52,4	0,02	11,1	60	0,01 ^c

Tab. 3: Isolierung von Cd bindendem Phytochelatin aus R. serpentina Zellen, die 5 Tage mit 300 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ belastet waren, wurden wie unter B. 2 beschrieben aufgearbeitet.

^a Protein wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt

^b Gewebe mit 280 g Frischgewicht oder 10,5 g Trockengewicht

^c Das salzfreie Lyophilisat dieser Fraktion wog 59,1 mg

Wie bereits die Vorversuche andeuteten, werden große Mengen an SM-bindendem Material unter Cd-Streß von den Zellkulturen synthetisiert. Aus Gewebe mit 10,5 g Trockengewicht konnten etwa 60 mg Phytochelatin mit einem Cd-Anteil von 11 mg isoliert werden; eine beachtliche Menge, doch lag der tatsächliche PC-Gehalt der Pflanzenzellen ungefähr 1,5 x höher, wie aus früheren Gelfiltrationsexperimenten von Rohextrakten Cd-belasteten Gewebes zu schließen ist. In den Gelfiltrationsexperimenten ließ sich eine mehr als 90% Bindung des Schwermetalls an das induzierbare Material, an Phytochelatin belegen (siehe C 1.3.). Das bedeutet, bezogen auf den Rohextrakt (Tab.

3), mehr als 17,7 mg Cd waren cheliiert an PC. Oder, wie aus dem Gewicht des Lyophilisats zu schließen, mindestens 90 mg Cd-haltiges PC befanden sich in 280 g des frischen Gewebes; das entspricht 0,9% des Trockengewichtes und ca. 30% des Protein-Peptid-Gehaltes des Zellextraktes.

Diese Zahlen verdeutlichen die drastische Induktion von Cd-bindender Substanz und die enorme Syntheseleistung der Pflanzenzellen.

Gleichzeitig zeigen sie, daß eine etwa 25-fache Reduzierung kontaminierender Proteine des Extraktes zu einem 90% reinen PC führen muß. Im Laufe der Phytochelatinreinigung konnte der Proteingehalt im isolierten PC auf 0.01 % des anfänglichen Wertes des Rohextraktes reduziert werden, der Cd-Verlust während der Isolation betrug nur 40%. Unter der Voraussetzung der generellen Nachweisbarkeit von Peptiden und Proteinen mit den erwähnten Proteinbestimmungsmethoden, läßt sich daraus eine etwa 1000 fache Verringerung unerwünschten Proteinmaterials ersehen. Selbstverständlich sind solche Kalkulationen mit Vorsicht zu betrachten, legen aber trotzdem nahe, daß Phytochelatin in besonders reiner Form isoliert werden konnte, wie auch später durch Sequenzierung bestätigt wurde.

Die Effektivität der verschiedenen Reinigungsschritte ist im denaturierenden Polyacrylamidgel nach Elektrophorese der einzelnen Fraktionen der Peptidisolierung und Coomassiefärbung zu erkennen (Abb. 8). Phytochelatin konnte dabei nicht angefärbt werden, sondern wurde durch Cd-Nachweis lokalisiert. Auf dem Gel wurden aliquote Proben mit jeweils 10 µg Cd getrennt, bzw. von den Fraktionen vor der Ammonsulfatfällung nur 5 µg Cd aufgetragen, um ein völliges Überladen der Gelspur zu vermeiden. Die Proben enthielten somit ungefähr 60 bzw. 30 µg PC. Eine deutliche Anreicherung wurde durch die Ammonsulfatfällung (Gelspur 3) erzielt, aber schwach gefärbte

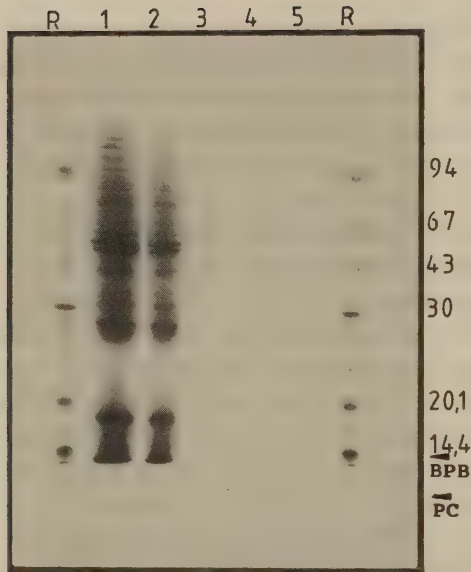


Abb. 8: Gelelektrophorese von Fraktionen der Phytochelatinsisolierung im 12,5% SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970). 1: Rohextrakt (5µg Cd); 2: DEAE-Eluat (5µg Cd); 3: Überstand der Ammonsulfatfällung (10µg Cd); 4: Konzentrat der Ultrafiltration (10µg Cd); 5: Cd-haltige Fraktion nach Gelfiltration (10 µg Cd); R: Referenzproteine: Phosphorylase b (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa), Lactalbumin (14,4 kDa). Der obere Bildrand entspricht der Startlinie, die beiden Pfeile kennzeichnen die Position von Bromphenolblau (BPB) und Phytochelatin (PC).

Proteinbanden waren noch vorhanden. Nach Gelfiltration war kein kontaminierendes Proteinmaterial mehr nachzuweisen. Phytochelatin konnte über Cd-Nachweis vor dem Laufmarker Bromphenolblau in einer Pufferdiskontinuität lokalisiert werden. Um PC besser trennen zu können, wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in 8 M Harnstoff nach der Methode von Swank und Munkries (1971) durchgeführt (Abb. 9).

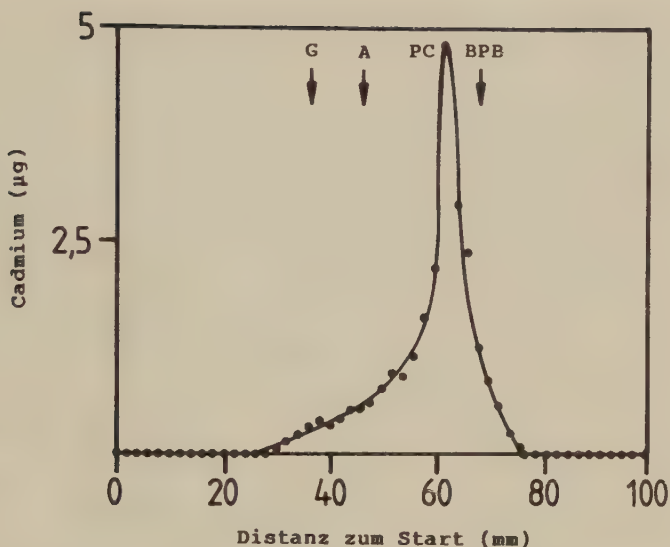


Abb. 9: Phytochelatinentrennung im 20% SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgel nach Swank und Munkries (1971). Phytochelatin wurde durch Cd-Bestimmung lokalisiert. Mit Pfeilen sind die Positionen für Gramicidin (G, 2 kDa), Actinomycin C (A, 1,28 kDa) und Bromphenolblau (BPB) gekennzeichnet. Trypsin-Inhibitor (6,5 kDa), nicht eingezeichnet, befand sich auf der Höhe von Gramicidin.

Zum Phytochelatinnachweis wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese in Streifen geschnitten, naß verascht und der Cd-Gehalt bestimmt. Es zeigte sich eine Cd-haltige Fraktion, die einen etwas geringeren R_f -Wert aufwies als Bromphenolblau und in ausgeprägtem Maße 'schwanzte'. Leider erwies sich diese Methode als nicht geeignet zur Molekulargewichtsbestimmung von PC, da Eichpeptide nicht gemäß ihrer Molgewichte getrennt wurden. Ein 'Schwanz' von Phytochelatin konnte in geringem Maße auch in der Gelfiltration der PC-Isolierung beobachtet werden (Abb. 10). Die Sephadex G-50 Chromato-

graphie ist ein notwendiger PC-Reinigungsschritt, wie aus dem Elutionsprofil hervorgeht, denn im Ausschlußvolumen (Fraktionen 8-10) befand sich ein hochmolekulares Proteinmaterial, das dadurch abgetrennt wurde. Aber auch geringe Mengen an niedermolekularen Substanzen konnten entfernt werden. Die Cd- und SH-haltigen Fraktionen (18-23) wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Der isolierte Cd-Phytochelatin-Komplex stand damit für eine nähere Charakterisierung zur Verfügung.

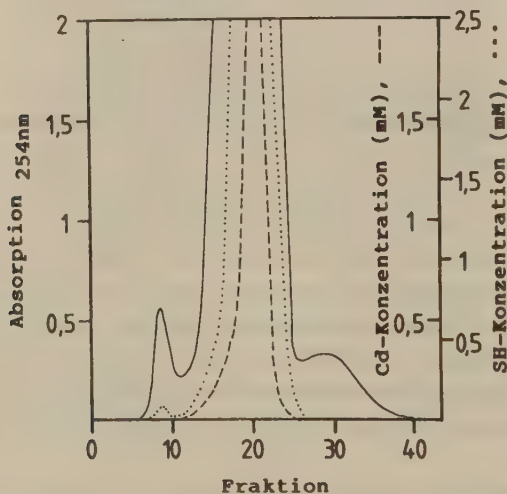


Abb. 10: Sephadex G-50 Chromatographie der Phytochelatinisolierung. Das durch die Ultrafiltration erhaltene Konzentrat (6,1 ml; siehe Tab. 3) wurde wie unter B 3. beschrieben, chromatographiert. Anschließend wurde der Cd- und SH-Gehalt der Fraktionen bestimmt und Fraktionen 18-23 vereinigt und lyophilisiert.

3. Charakterisierung des Phytochelatin-Cadmium-Komplexes

Nachdem nun hochgereinigtes PC zur Verfügung stand, konnte es näher in Bezug auf die Art der Schwermetallkomplexierung charakterisiert und das Cd- /SH-Verhältnis bestimmt werden. Dadurch sollten Hinweise auf etwaige Analogien des pflanzlichen Peptidmaterials zu tierischen Metallothioneinen erhalten werden. Auch das Molekulargewicht des Peptidkomplexes war von besonderem Interesse, weil sich darin ein Unterschied zu den isolierten SM-bindenden Proteinen aus differenzierten Pflanzen abzeichnete.

3.1. UV- und CD-Spektrum

Metall-Thiolat-Komplexe manifestieren sich in breiten Absorptionsbanden des "charge-transfer" Typus, meist im UV-Bereich und sind kennzeichnend für das jeweilige Metall. Cd-Thiolate besitzen eine Absorptionsschulter bei etwa 250 nm, wie auch am Cd-MT zu erkennen ist, da keine aromatischen Aminosäuren im Molekül vorhanden sind (Kägi und Vallee 1961).

Die Bindung zwischen Metall und Sulfhydrylgruppe läßt sich durch Ansäuern aufheben und damit verschwindet auch die charakteristische Absorptionsbande. Abhängig von der Bindungsstärke des Thiolatkomplexes sind dazu unterschiedliche Protonenkonzentrationen erforderlich. Zink ist relativ leicht gebunden. Bei einem pH zwischen 3,5 und 4,5 liegen etwa 50% des Zinks von MT dissoziiert vor, während für Cadmium ein pH von 2,5-3,5 notwendig ist und für Kupfer ein pH unter 1 (Kägi und Vallee 1960 und 1961, Rupp und Weser 1978). Die Dissoziation ist reversibel. Nach Anheben des pH-Wertes bildet sich wieder der Metall-SH-Komplex aus.

Daß Phytochelatin einen hohen SH-Gehalt aufweist, hatten

bereits die Vorversuche gezeigt, und deshalb war eine Cd-SH-Komplexierung zu erwarten. In der Tat besitzt Cd-PC im UV-Absorptionsspektrum bei ungefähr 250 nm eine Schulter (Abb. 11-1). Nach Ansäuern auf pH 0,4 ist keine Absorption im Bereich von 250 bis 300 nm festzustellen (Abb. 11-2), zurückzuführen auf eine vollständige Disso-

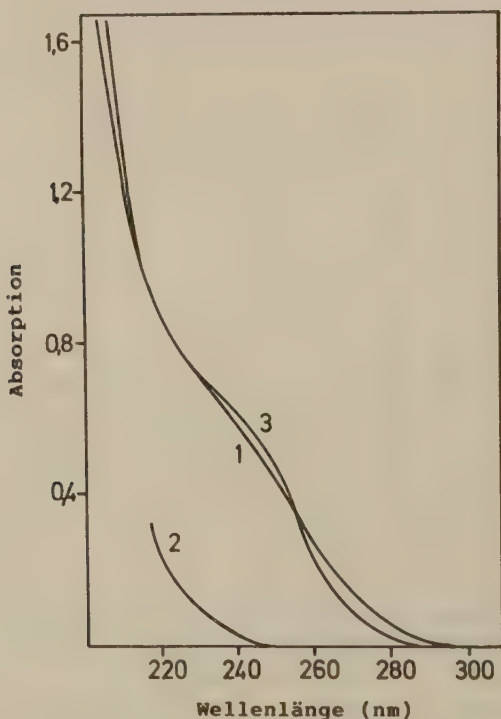


Abb. 11: UV-Absorptionsspektrum von Cadmium-Phytochelatin

In einer Küvette mit 1 cm Lichtweg wurde von 50 μg PC in 1 ml 5 mM Tris-Cl Puffer, pH 7,8, das UV-Absorptionsspektrum aufgenommen (1), dann durch Ansäuern mit HCl der pH auf 0,4 gesenkt (2) und anschließend unter N_2 -Atmosphäre mit NaOH neutralisiert (3). Der molare Absorptionskoeffizient $\epsilon_{245 \text{ nm}}$ des nativen Cd-PC betrug $3,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bezogen auf einen 3,6 kDa Komplex (siehe C 3.3.).

ziation des Cd-SH-Komplexes und ebenfalls auf ein Fehlen von aromatischen Aminosäuren im PC-Molekül. Nach Neutralisierung des pH-Wertes erscheint die Absorptionsbande bei 250 nm wieder, wenngleich die Schulter jetzt deutlicher zu erkennen ist (Abb. 11-3), möglicherweise ein Anzeichen einer Umstrukturierung des Cd-SH-'Clusters'.

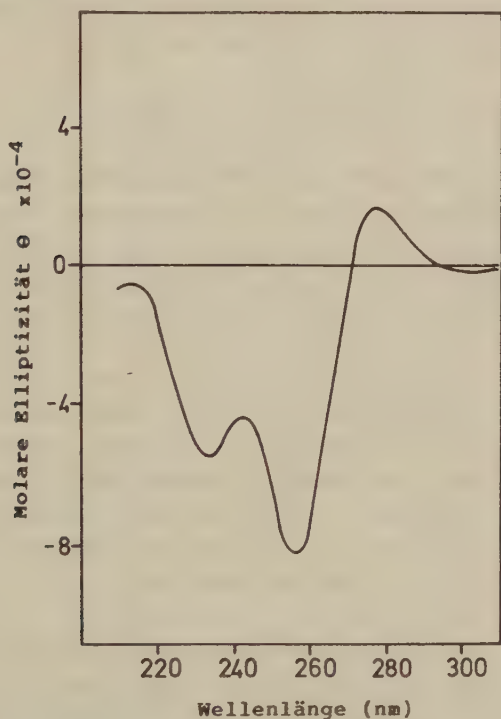


Abb. 12: Circular-dichroitisches Spektrum von Cd-Phytochelatine. Von 50 μg PC in 1 ml 0,05 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,1, wurde in einer Zelle von 0,2 cm Schichtdicke in einem Polarimeter das Spektrum aufgenommen. Die molare Elliptizität ist angegeben in Gradeinheiten/ $\text{cm}^2 \cdot \text{dMol}$.

Die Ergebnisse belegen klar eine Cd-SH-Interaktion und stehen im Einklang mit einem Cd-MT. In dieser Hinsicht aussagekräftiger sind circular-dichroitische Spektren, in denen assymmetrisch geformte Moleküle und die Metall-Schwefel-Ligandierung charakteristische Signale induzieren können. Ein solches Spektrum von Cd-PC ist in Abb. 12 zu sehen mit Cottonextrema bei 278 nm (positiv), 257 und 233 nm (beide negativ). Es ist ein dem MT ähnliches, aber doch verschiedenes Spektrum und weist auf mögliche Strukturunterschiede zwischen PC und MT hin.

3.2. Schwermetall- und Sulfhydrylgehalt

Zum Vergleich von tierischen und pflanzlichen Schwermetall-bindenden und induzierbaren Substanzen konnte auch die Relation von Cd zu SH-Gruppen verwendet werden, da eine gemeinsame Struktur des Thiolatkomplexes ein identisches Metall/Schwefel-Verhältnis impliziert. MT aus Säugern cheliiert über 20 Cysteinreste 7 Cd- oder Zn-Ionen oder 1 divalentes Metallion pro 2,9 Sulfhydrylgruppen, wie aus Daten rekonstituierter Apo-Metalllothioneine hervorgeht (Kägi und Nordberg 1979). Nur nach Rekonstitution konnte reines Cd-MT mit einem Metallanteil von 11,4 Gewichtsprozent erhalten werden, denn aus tierischem Gewebe isoliertes Cd-MT wies beträchtliche Mengen an Zn auf (bis zu 20% der Molmenge von Cd).

Im Gegensatz dazu liegt das Phytochelatin aus Rauvolfia serpentina praktisch als reiner Cd-Komplex vor mit Spuren an Zn und Cu (Tab. 4). Die Metallbestimmungen von vier PC-Präparationen ergaben einen mittleren Gehalt von 14,5% Cd (w/w) bzw. 1,3 mmol Cd pro Gramm Isolat. Im Vergleich dazu sind die geringen Mengen an Zink und Kupfer von zusammen etwa 1% der Cd-Molmenge zu vernachlässigen. Nachdem für die Schwermetallbelastung $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ mit nur 0,01-prozentiger Verunreinigung verwendet wurde,

entstammen die anderen Metalle offensichtlich der pflanzlichen Nährlösung, die $37 \mu\text{M Zn}^{2+}$ und $0,1 \mu\text{M Cu}^{2+}$ enthält. Die Analysen zeigen, daß das pflanzliche Cd bindende System etwa 30% mehr Cd pro Gewichtseinheit cheliert und damit mehr Metall pro Aminosäure als MT.

PC- Isolat	Cadmium		Kupfer		Zink	
	(%) ^a	($\mu\text{Mol/mg}$) ^b	(%)	($\mu\text{Mol/mg}$)	(%)	($\mu\text{Mol/mg}$)
I	14,4	1,28	0,028	0,005	0,041	0,006
II	14,1	1,25	0,040	0,007	0,038	0,006
III	13,9	1,24	0,069	0,013	0,051	0,008
IV	15,7	1,40	0,020	0,007	0,037	0,006
Mittel	14,5	1,29	0,039	0,008	0,042	0,007

Tab. 4: Schwermetallgehalt von Cd-Phytochelatin aus R. serpentina

^a Die Analysenwerte sind in Gewichtsprozenten angegeben, bezogen auf den isolierten Komplex. ^b $\mu\text{Mol Metall/mg Cd-PC}$

Ansatz	E_{410} ^a	Cystein $\mu\text{Mol/mg PC}$	Cadmium $\mu\text{Mol/mg PC}$	Cd:Cys
I	0,215	3,04	1,28	1:2,4
II	0,237	3,36	1,28	1:2,6
III	0,211	3,00	1,28	1:2,3
Mittelwert	0,221	3,13	1,28	1:2,4

Tab. 5: Bestimmung der Cadmium-Cystein Relation in Phytochelatin aus R. serpentina. Die Messungen wurden mit $5 \mu\text{g PC}$ mit einem Cd-Gehalt von 14,4% in 1 ml N_2 -gesättigtem Puffer (siehe B 2.3.) durchgeführt. ^a Die Extinktionsdifferenz ermittelt nach 5 minütiger Reaktion mit Ellman-Reagens bei 410 nm in einer Küvette mit 1 cm Lichtweg. PC-Reduktion mit Mercaptoethanol (100-facher molarer Überschuß, 1 Stunde) und anschließendes Abblasen des Reduktionsmittels mit N_2 veränderte den SH-Gehalt von PC nicht.

Die Erklärung muß in einem höheren Cysteingehalt von Phytochelatin gegenüber MT zu suchen sein, und/oder in einem größeren Cd/SH-Verhältnis. Um diesen Punkt zu klären, wurde auch der SH-Anteil von PC durch Umsatz mit Ellman-Reagens in Gegenwart von EDTA bestimmt (Tab. 5). Mit 3,1 μ Mol Cys/ mg Cd-PC besitzt Phytochelatin einen um 8% höheren Gehalt als Cd-MT. Nachdem aber PC 30% mehr Cd bindet, zeichnet sich eine unterschiedliche Cd/SH-Relation ab, die mit 1:2,4 bestimmt wurde. Damit wurde ein bei MT bisher nicht bekannt gewordener, hoher Wert gefunden, zumal in MT-Isolaten häufig nur 6 Grammatome Metall pro Mol Protein, also ein Verhältnis von 1:3,3, nachgewiesen werden konnte (Kägi und Vallee 1960, Nordberg et. al 1972, Bühler und Kägi 1974). Die Ursachen für den niedrigeren Schwermetallgehalt der isolierten gegenüber den rekonstituierten MT-Präparationen sind in einer nicht vollständigen Absättigung des Thiolatkomplexes mit Metallionen bereits in der Zelle zu sehen und in einem Metallverlust während der Isolierung durch kompetitive Chelierung der Ionen an SH-haltige Oxidationsschutzmittel, z.B. Mercaptoethanol. Mercaptoethanol wurde auch im Aufschlußpuffer der PC-Reinigung verwendet. Ein Verzicht darauf oder deutlich geringere Konzentrationen als 10 mM führten zu einer gesteigerten Phenoloxidaseaktivität und letztlich zu einem grünlich-braunen PC-Isolat. Wahrscheinlich liegt die Cd:SH Relation von rekonstituiertem PC noch näher bei 1:2. Tatsächlich konnte nach Rekonstitution ein Wert von 1:1,95 gemessen werden (siehe 4.5.). Offensichtlich handelt es sich bei Phytochelatin um eine effizientere Form der Schwermetallkomplexierung im Vergleich zu tierischem Metallothionein. Das zeigt sich in einem höheren prozentualen Metallgehalt und in einem höheren Metall/Schwefel Verhältnis von 1:2 gegenüber 1:3 bei MT.

3.3. Molekulargewicht

Eine weitere Diskrepanz von Säuger-MT und Pflanzen-PC war bereits durch Vorversuche im Molekulargewicht offenkundig. Phytochelatin aus *R. serpentina* zeigte in Gel-filtrationsexperimenten ein Molekulargewicht von ca. 3-4 kDa. Damit unterscheidet es sich auch von anderen Cd-bindenden Proteinen, die aus differenzierten Tomaten- und Kohlpflanzen isoliert worden waren und ein Molekulargewicht von 10 kDa besaßen (Bartolf et al. 1980, Wagner und Trotter 1982). In nachstehenden Experimenten sollte das Molekulargewicht von Cd-PC näher bestimmt werden. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese konnte dazu

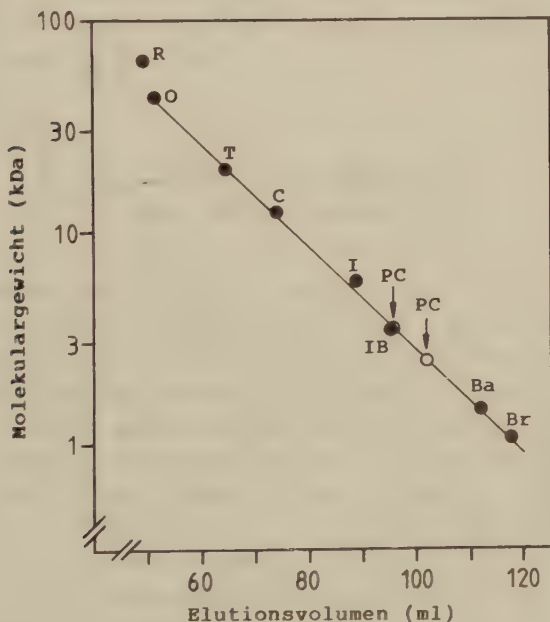


Abb. 13: Molekulargewichtsbestimmung von Phytochelatin durch Gelfiltration mit Sephadex G-50. Die beiden Pfeile kennzeichnen zwei Cd-Phytochelatin-Komplexe von 3,6 kDa und 2,5 kDa. Die

Säule (1,5x90 cm) wurde kalibriert mit Rinderserumalbumin (R, 67 kDa), Ovalbumin (O, 44 kDa), Trypsin-Inhibitor (T, 20,1 kDa), Cytochrom C (C, 12,3 kDa), Insulin (I, 6,0 kDa), Insulinkette B (IB, 3,45 kDa), Bacitracin (Ba, 1,45 kDa) und Bradykinin (Br, 1,06 kDa). Die Chromatographie erfolgte in 0,1 M KCl, 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, mit einer Flußrate von 11,6 ml/h und 5 Fraktionen/h. Die Elution der Substanzen wurde bei 280 bzw. 254 nm verfolgt.

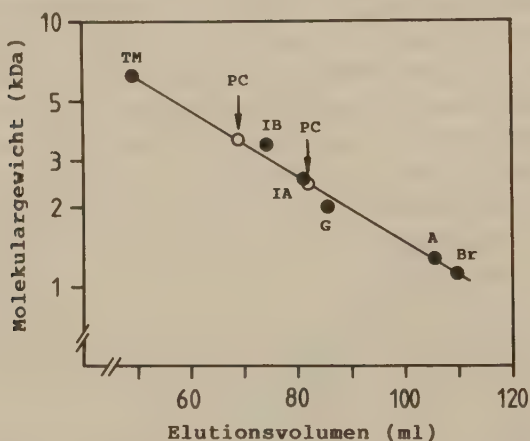


Abb. 14: Molekulargewichtsbestimmung von Phytochelatrin durch Gelfiltration mit Biogel P6. Die Pfeile bezeichnen zwei Cd-Phytochelatrin-Komplexe (Cd-PC). Säulenlänge, Chromatographie und Eichsubstanzen wie in Abb. 13. Der Puffer enthielt zusätzlich 1 mM Mercaptoethanol. Als weitere Eichsubstanzen dienten: Trypsin-Inhibitor aus Mungobohne (TM, 6,5 kDa), Insulin A (IA, 2,5 kDa), Gramicidin (G, 2,06 kDa) und Actinomycin C (A, 1,28 kDa).

nicht eingesetzt werden, da in der Methode nach Lämmli (1970) PC mit einer vor Bromphenolblau befindlichen Pufferdiskontinuität wanderte und im SDS-Harnstoff-Gel nach Swank und Munkries (1971) eine Trennung der Eich-peptide erfolgte, die keine Korrelation zum Molekularge-wicht erkennen ließ (siehe C 2.). Deshalb wurde die

Bestimmung durch Gelfiltration vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde eine Sephadex G-50 Säule mit Proteinen und Peptiden bekannten Molekulargewichts geeicht (Abb. 13). Die Chromatographie des Cd-PC zeigte zwei voneinander schlecht getrennte Moleküle, für die aufgrund ihres Retentionsverhaltens ein M_r von 3,60 kDa ermittelt wurde und, mit einem Anteil von etwa 30%, von 2,48 kDa. Innerhalb der experimentellen Toleranz wurden diese Molekulargewichte durch Gelfiltrationsbestimmungen mit einem anderen Säulenmaterial, Biogel P6, bestätigt, nämlich 3,55 und 2,45 kDa (Abb. 14). Die Verwendung dieses Säulenmaterials mit einem Trennbereich von 1-6 kDa erwies sich insofern vorteilhaft, als dadurch die beiden PC-Komponenten getrennt werden konnten (Abb. 15). Beide Fraktionen waren Cd- und SH-positiv und stellen zwei verschiedene Cd-PC-Komplexe dar.

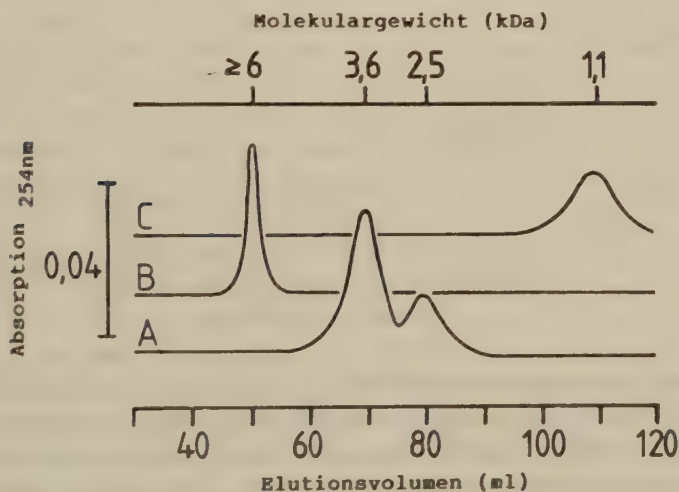


Abb. 15: Elutionsprofile der Biogel P6 Chromatographie
Bedingungen wie in Abb. 14. Es wurden 50 μg Phytochelatins (A),
100 μg Cytochrom C (B) und 400 μg Bradykinin (C) chromatogra-
phiert und bei 254 nm detektiert.

Die überraschend gute Übereinstimmung beider Molekulargewichtsdeterminationen darf nicht darüber hinwegtäuschen, daß die Angaben mit einem größeren Fehler behaftet sein können, weil nur globuläre Proteine ein dieser Messung unterstelltes, indirekt proportionales Verhalten zwischen Logarithmus des Molekulargewichts und Elutionsvolumen zeigen. Ohne Zweifel steht jedoch fest, daß Phytochelatin kein 10 kDa Protein ist. Im Unterschied zu den Molekulargewichtsbestimmungen der pflanzlichen, Cd-

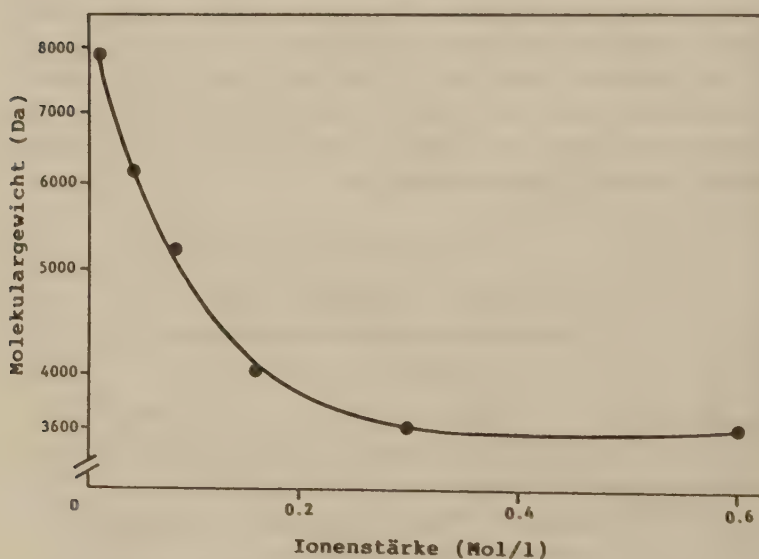


Abb. 16: Einfluß der Ionenstärke auf das apparente Molekulargewicht von Phytochelatin, bestimmt durch Gelfiltration. Die Sephadex G-50 Chromatographie wurde wie in Abb. 13 beschrieben durchgeführt. Als Puffer wurde 5 oder 10 mM Tris-Cl, pH 7,8, bis zur gewünschten Ionenstärke mit NaCl versetzt, verwendet. Pro Lauf wurden 0,5 mg PC auf die Säule appliziert, die für jede Ionenstärke mit den in Abb. 13 erwähnten Proteinen kalibriert war. In der Auswertung wurde nur der 3,6 kDa PC-Komplex berücksichtigt.

bindenden 10 kDa Proteine wurden diese Gelchromatographien mit einem Puffer relativ hoher Ionenstärke (0,3 M) durchgeführt. Eine Überprüfung des Retentionsverhaltens von PC unter den von Bartolf et al. (1980) und Wagner und Trotter (1982) publizierten Bedingungen führte überraschenderweise zu veränderten R_f -Werten. Deshalb wurde der Einfluß der Ionenstärke des Elutionspuffers auf die Molekulargewichtsbestimmung des Cd-PC-Komplexes eingehender untersucht, mit dem Ergebnis einer starken Abhängigkeit des apparenten Molekulargewichts von der Ionenstärke (Abb. 16). Von etwa 8 kDa in 5 mM Tris-Cl Puffer verschiebt sich das gemessene Molekulargewicht mit steigender Ionenkonzentration des verwendeten Puffers zu einer unteren Grenze von 3,6 kDa ab einer Ionenstärke von ca. 0,3 M. Unter den von Bartolf et al. (1980) und Wagner und Trotter (1982) verwendeten Ionenkonzentrationen, nämlich 0,01 und 0,04 M, betrug das apparente Molekulargewicht von PC ca. 8 und 6,5 kDa. Dieses bemerkenswerte Phänomen konnte auch von Kägi und Mitarbeitern (Vasák et al. 1984) an MT beobachtet werden und wurde, experimentell belegt, als eine Konformationsänderung des Metallothioneinmoleküls von einer länglichen zu einer mehr globulären Gestalt interpretiert.

3.4. Aminosäurezusammensetzung

Aus den hier vorgestellten Eigenschaften konnte auf ein stark anionisches, cysteinreiches PC-Molekül ohne aromatische Aminosäuren geschlossen werden. Die exakte Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung erfordert die Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Aminosäuren des hydrolysierten Peptidmaterials. Die Hydrolyse erfolgt im allgemeinen unter Luftausschluß in 6 n HCl für 20 Stunden bei 110°C. Unter den Hydrolysebedingungen werden Cysteinreste oxidiert und teilweise zerstört, so

daß eine quantitative Auswertung dieser Aminosäure eine Modifizierung der SH-Gruppe erfordert, z.B. Carboxymethylierung mit Jodacetat oder Oxidation mit Perameisensäure zur Sulfongruppe. Letzteres war aufgrund vollständiger Umsetzung der SH-Gruppe die Methode der Wahl (vgl. B 4.1. und 4.2.). Nicht nur Cystein ist hierbei hydrolyseempfindlich, sondern auch Glutamin und Asparagin, die quantitativ zu Glutamin- und Asparaginsäure desamidiert werden. Auch Tryptophan und Hydroxy- Aminosäuren wie Serin und Threonin werden je nach Hydrolysebedingungen zerstört. Deshalb ist es ratsam, ein Protein bekannter Aminosäurezusammensetzung parallel zu analysieren, um dadurch einen Korrekturfaktor für die jeweilige Aminosäure zur Verfügung zu haben. Das Tripeptid Glutathion mit den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin erwies sich für PC als ideale Referenzsubstanz. Wie das Chromatogramm in Abb. 17-A zeigt, konnten nur diese 3 Aminosäuren im PC-Hydrolysat identifiziert werden. Die stark saure Cysteinsäure eluierte zuerst von der Kationentauschersäule des Aminosäureanalysators, gefolgt von einer zweiten Hauptkomponente, Glutaminsäure, und schließlich Glycin. Die 4. und letzte Fraktion ist auf NH_4^+ zurückzuführen. Auftretende kleine Peaks waren auch in der hochgereinigten Glutathionreferenz (Abb. 17-B) zu finden und wahrscheinlich Analysenartefakte. Sie stellten mit einem Gesamtgehalt von 1% der Hauptaminosäuren eine nicht sinnvoll kalkulierbare Größe für einen 3,6 kDa Komplex dar. Eine quantitative Auswertung erfolgte über die Flächen der einzelnen Fraktionen im Chromatogramm, die durch einen Integrator synchron mit der Aufzeichnung des Chromatogramms errechnet und durch einen Aminosäurestandard (Abb. 17-C) kalibriert wurden. Die Aminosäuregehalte von PC sind aus der Tab. 7 zu ersehen. Neben geringen Mengen an Glycin (10 Mol%) enthält das Schwermetall-bindende Peptidmaterial 45 Mol% Cystein und eine äquimolare Summe an Glutamin-

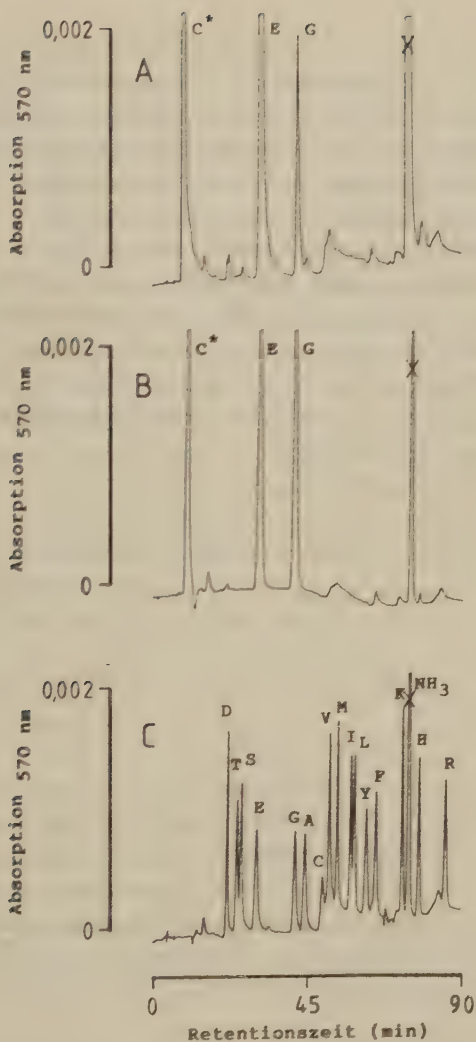


Abb. 17: Chromatogramme der Aminosäureanalyse von Cd-Phytochelat-
 in aus *P. serpentina* (A), Glutathion (B) und 2,5 nMol Aminosäu-
 restandard (C). C* steht für Cysteinsäure, E für Glutaminsäure,
 G für Glycin und C für Cystin. Alle anderen Aminosäuren sind mit
 dem Einbuchstabensymbol bezeichnet (siehe Abkürzungen).

säure und Glutamin. Inwieweit die Cysteinreste oxidiert oder reduziert im PC-Molekül vorliegen, ist dieser Aminosäureanalyse nicht zu entnehmen, da Perameisensäure sowohl SH-Gruppen als auch Disulfidbrücken zur Sulfonsäure oxidiert. Jedoch zeigten vorangegangene Experimente mit Ellman-Reagens keinen Unterschied im SH-Gehalt von PC nach zusätzlicher Reduktion der Probe mit Mercaptoethanol und Abblasen des Reduktionsmittels mit Stickstoff, so daß eine ausschließlich reduzierte Form der schwefelhaltigen Aminosäure angenommen werden muß (C 3.2.). Die Bestimmung wies einen Gehalt von 3,13 μMol SH/mg PC nach, was die Aminosäureanalyse des gleichen PC-Materials im wesentlichen, mit einem 4% höheren Wert für den Cysteinanteil (3,28 μMol Cys/mg PC), bestätigte (Tab. 6).

Aminosäure	As.-Gehalt ($\mu\text{Mol/mg}$ PC)	Molverhältnis im PC-Komplex (%)
Glu ^a	3,26	44,7
Cys ^b	3,28	44,9
Gly	0,76	10,4

Tab. 6: Aminosäurezusammensetzung von Cd-Phytochelatin

^a Summe von Glutaminsäure und desamidiertem Glutamin

^b Bestimmt als Cysteinsäure

Das Phytochelatin besitzt mit nur 3 oder 4 verschiedenen Aminosäuren eine für Proteine oder Peptide von mehreren kDa Molekulargewicht bislang unbekannt geringe Aminosäurevielfalt. Diese ungewöhnliche Aminosäurezusammen-

setzung ließ auch die Bestimmung der Stereokonfiguration der Aminosäuren angebracht erscheinen. Im allgemeinen werden dazu stereospezifische Enzyme eingesetzt, wie D- und L-Aminosäureoxidasen. Beide Oxidasen setzen in erster Linie hydrophobe Aminosäuren um, wobei die Amino- gruppe unter Bildung einer Ketogruppe am C^α-Atom der Aminosäure desaminiert wird. Saure Substrate wie die Glutaminsäure werden nicht akzeptiert. Deshalb bot sich hier die Verwendung von L-Glutaminsäuredecarboxylase an. Das PC-Hydrolysat konnte zur Bestimmung der Stereokonfiguration der Glutaminsäure herangezogen werden, da die saure Hydrolyse zu einer in der Praxis nicht relevanten

	nach Inkubation		Umsatz ^b
	(nMol Glu)	(nMol GABS ^c)	(%)
PC ^a	0	8,2	100
D-Glu	5,0	0	0
L-Glu	0	5,1	100

Tab. 7: Bestimmung der Stereokonfiguration der Glutaminsäure von Phytochelatin mit L- Glutaminsäuredecarboxylase

^a als Hydrolysat eingesetzt

^b Quantifiziert durch Aminosäureanalyse

^c γ-Aminobuttersäure

Razemisierung von weniger als 1% führt (Ingles, 1983). Wie der Tab. 7 zu entnehmen, erfolgte ein vollständiger Umsatz der PC-Glutaminsäure identisch der L-Glutaminsäure des Kontrollansatzes, während die D-Form nicht decarboxyliert wurde. Damit belegen die Daten klar eine L-Konfiguration der Glutaminsäure in PC.

Für die Verifizierung von L-Cystein in PC wurde das Hydrolysat des S-benzylierten Peptids verwendet, um ein hydrophobes Substrat für die L-Aminosäureoxidase, gewonnen aus Schlangengift, zu haben. Als Kontrollen dienten wieder L-/D-Isomere von Cystein und Glutathion. Wie die Auswertung der Inkubationsansätze mittels Aminosäureanalysator ergab, konnte S-benzyliertes L-Cystein nur zu etwa 80% umgesetzt werden, möglicherweise durch inhibierende Substanzen aus der Modifikationsreaktion verursacht. Eine Steigerung der Enzymkonzentration resultierte in einer Zunahme der unspezifischen Umsetzung von D-Cys. Versuche mit D-Aminosäureoxidase waren nicht erfolgreicher.

S-Benzylierte Derivate	nMol eingesetzt	nMol umgesetzt	Umsatz (%)
L-Cys	5,0	4,3	86
D-Cys	5,0	0,4	8
Glutathion ^a	3,7	2,9	78
PC ^a	4,8	3,6	75

Tab. 8: Bestimmung der Stereokonfiguration des Cysteins aus
Phytochelatin mit L-Aminosäureoxidase

^a als Hydrolysat verwendet

Da die Daten der Tab. 8 eine vergleichbare Desaminierung von L-Cystein und Cystein aus Glutathion bzw. Phytochelatin zeigen, kann auf eine L-Konfiguration von Cystein im PC-Molekül geschlossen werden.

4. Primärstruktur der Phytochelatine

Ein wichtiger Parameter der Proteincharakterisierung ist die Aminosäuresequenz. Aus der Anordnung von hydrophoben und -philen Aminosäuren können erste Aussagen über die Sekundärstruktur des Moleküls getroffen werden. Auch lassen sich aus der Primärstruktur Nucleotidsequenzen als Hybridisierungsproben zur Klonierung des entsprechenden Gens ableiten. Im Hinblick auf eine Klonierung ist der Aufbau des Moleküls, ohne oder mit (verschiedenen) Untereinheiten, von Bedeutung. Im allgemeinen läßt sich dieser Punkt durch Elektrophorese des Proteins im denaturierenden und reduzierenden Polyacrylamidgel klären, jedoch waren entsprechende Versuche mit dem hochanionischen Phytochelat in nicht aussagekräftig (siehe C 2.). Eine schnell ermittelte Primärstruktur im Aminosäuresequenator hätte auch darüber Auskunft gegeben, aber Versuche, durch direkten Edmanabbau die Sequenz zu bestimmen, schlugen fehl, erklärbar durch eine möglicherweise den NH_2 -Terminus blockierende Gruppe. Aus diesem Grunde sollte ein HPLC-System etabliert werden, um PC unter metallfreien Bedingungen trennen zu können, aber auch geeignet, um chemisch oder enzymatisch erzeugte Peptidfragmente zu isolieren.

4.1. Monomere des Phytochelatinkomplexes

Zwei Möglichkeiten boten sich an: Die Modifizierung der Cysteine, mit dem Nachteil des unvollständigen Umsatzes bei Carboxymethylierung bzw. bei Perameisensäureoxidation der Schaffung extrem saurer Sulfonsäuregruppen, oder die Chromatographie unter SH-stabilen, Metall-dissoziierenden pH-Werten. Letzteres erschien erfolgversprechender und in der Tat gelang es, unter sauren Bedingungen, bei pH 2,7, PC auf einer 'reversed phase' C18-Säule zu chromatographieren. Zur Detektion des Schwermetall-

freien Materials wurde die Absorption der Peptidbindung bei 220 nm gemessen. Eine Trennung in 5 metallfreie Komponenten (a-e) resultierte (Abb.18A). Zusätzliche, der Chromatographie vorangegangene Reduktion der Probe mit NaBH_4 , um Disulfide zu spalten, veränderte das Elutionsprofil nicht. Folglich mußten diese, wie Metallanalysen belegten, Cd-freien Substanzen verschiedene Monomere repräsentieren. Ein in vivo ^{35}S -markiertes Phytochelatin, das nach Fütterung Cd-belasteter R. serpentina Zellen mit radioaktivem Sulfat isoliert werden konnte, zeigte nach HPLC und kontinuierlicher Messung der β -Strahlung fünf Fraktionen mit identischem Elutionsverhalten (Abb. 18B). Da alle Fraktionen Schwefel enthielten, mußten sie verschiedene, cysteinhaltige Peptidspezies des Cd-Phytochelatin-Komplexes darstellen.

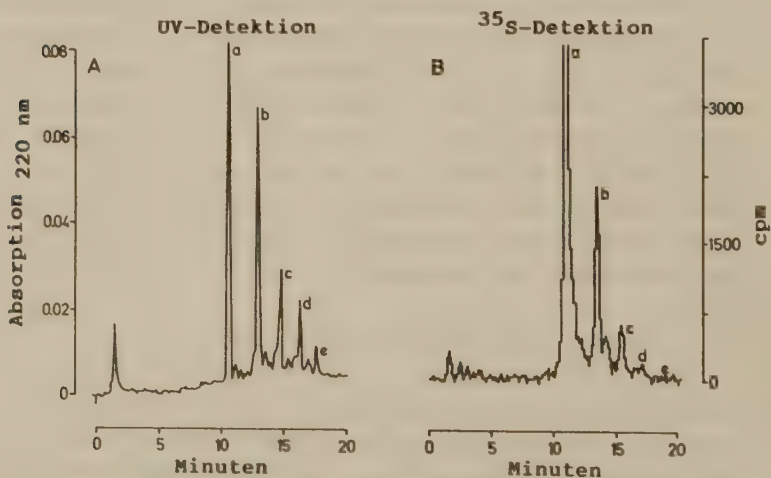


Abb. 18: HPLC von Phytochelatin unter metalledissoziierenden Bedingungen mit Detektion der UV-Absorption bei 220 nm (A) und der β -Strahlung (B). Zu Rauvolfia serpentina Zellsuspensionskulturen wurde $200\ \mu\text{M}\ \text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ und $2\ \mu\text{Ci}\ ^{35}\text{SO}_4^{2-}/\text{ml}$ gegeben. Nach 2-tägiger Belastung erfolgte die Isolation von Phytochelatin. Buchstaben a-e markieren die verschiedenen Fraktionen der PC-Monomere.

Zur näheren Untersuchung der Komponenten a-e wurden diese mit Hilfe einer semipräparativen HPLC-Säule isoliert (vgl. B 4.6.) und ihre Aminosäurezusammensetzung nach Oxidation mit Perameisensäure bestimmt (Tab. 9).

Amino- säure	HPLC-Fraktion				
	a	b	c	d	e
(in Molprozent)					
Glu	43,6	45,2	45,8	45,8	46,1
Cys	42,6	44,1	45,1	45,8	46,3
Gly	13,8	10,7	9,1	8,4	7,6
(relativ zu Glycin)					
Glu	3,2	4,2	5,0	5,5	6,1
Cys	3,1	4,1	5,0	5,5	6,1
Gly	1	1	1	1	1

Tab. 9: Aminosäurezusammensetzung der Phytochelatinmonomere
Die Peptide wurden durch präparative HPLC isoliert und mit a-e wie in Abb. 18 bezeichnet. Cystein wurde als Cysteinsäure bestimmt.

Aus den Analysen der Monomere ist, gleich der Analyse des PC-Komplexes (vgl. C 3.4), ein äquimolares Verhältnis von Glu und Cys zu ersehen. Somit unterscheiden sich die einzelnen Peptide lediglich in ihrem Glycingehalt, mit der auffallenden Korrelation eines geringeren Glycinanteils mit steigender Retention des einzelnen Pep-

tids in der HPLC. Setzt man Glycin als 1, besäße Komponente a ein Aminosäureverhältnis von annähernd 3:3:1, b von 4:4:1, und c von 5:5:1 (Tab. 9). Für Substanzen d und e liegen die geringen Glycindifferenzen innerhalb der Meßtoleranz, so daß nur auf eine ungefähre Glu bzw. Cys:Gly Relation von 6:1 geschlossen werden kann. Liegen in den verschiedenen Fraktionen einheitliche Peptide vor, so muß deren Aminosäuresequenz aus einem ganzzahligen Vielfachen dieser Relationen bestehen. Trägt man dem Molekulargewicht von PC (3,6 kDa) und Aminosäuren (0,11 kDa) Rechnung, sollte der Cd-Komplex maximal 30 Aminosäurereste umfassen. In Anbetracht der verschiedenen Peptide des PC-Komplexes handelt es sich wahrscheinlich um sehr kurze Peptidketten u.a. von 7, 9 und 11 Aminosäuren.

4.2. Terminale Aminosäuren

Einen weiteren Einblick in die Sequenz der PC-Monomere ermöglicht die Bestimmung der terminalen Aminosäuren. Carboxyterminale Aminosäuren sind sowohl chemisch durch Hydrazinolyse (Schroeder 1972) als auch enzymatisch mit Carboxypeptidasen (Ambler 1972) bestimmbar. In der Hydrazinolyse werden die Peptidbindungen unter Umwandlung aller Aminosäuren außer der C-terminalen in Hydrazide gespalten. Der C-termiale Rest liegt als freie Säure vor, die chromatographisch identifiziert werden kann. Nach Hydrazinolyse von PC konnte ausschließlich Glycin als underivatisierte Aminosäure nachgewiesen werden (Abb. 19A). Eine parallele Hydrolyse mit gleicher PC-Einwaage zeigte im Aminosäurechromatogramm eine identische Menge (98% der Hydrazinolyse) an Glycin (Abb. 19B). Somit bildet Glycin den C-Terminus der PC-Monomere, da in diesem Versuch der PC-Komplex, also das Gemisch der einzelnen Peptide, eingesetzt worden war.

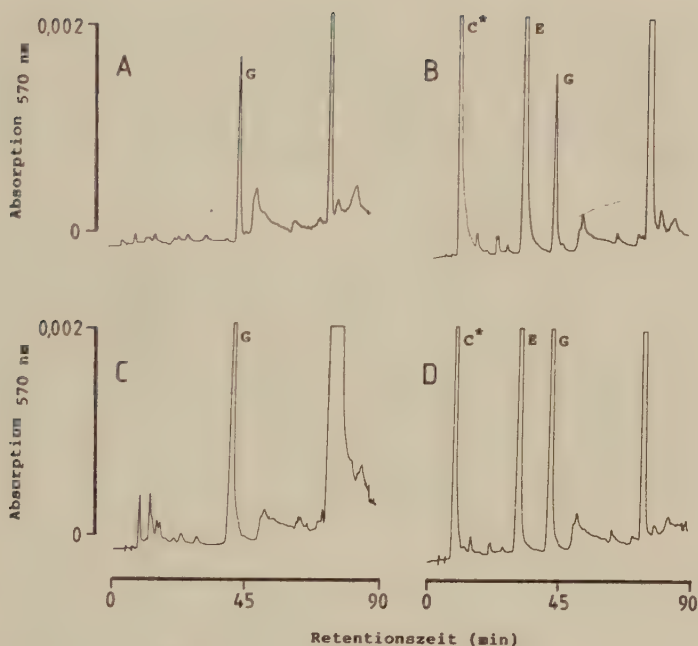


Abb. 19: Aminosäurechromatogramme nach Hydrazinolyse (A) und Hydrolyse (B) von 10 µg Perameisensäure-oxidiertem Phytochelatin-komplex. Als Kontrolle dienten 10 µg parallel hydrazinolytiertes (C) und hydrolysiertes (D) Glutathion.

Nachdem sich das gesamte Glycin C-terminal befindet, müssen die einzelnen PC-Moleküle tatsächlich Kettenlängen von 7, 9, 11 und mehr Aminosäuren haben.

Zur Bestätigung des vorangegangenen Versuchs wurde ein Carboxypeptidase-Abbau von PC durchgeführt, und gleichzeitig durch Abspalten nachfolgender Aminosäuren ein Ansequenzieren des Peptidmaterials erwartet. Inkubation von S-carboxymethyliertem PC mit Carboxypeptidase Y aus Hefe führte zur erwarteten Freisetzung von Glycin (Abb. 20). Doch war dazu eine 10 fache höhere Enzymmenge

gegenüber der Vorschrift von Hayashi (1976) erforderlich und trotz des deutlichen Enzymüberschusses lag der Umsatz selbst nach dreistündiger Reaktionszeit nur bei etwa 5% der eingesetzten Molmenge (Abb. 20). Andere Aminosäuren konnten nicht nachgewiesen werden.

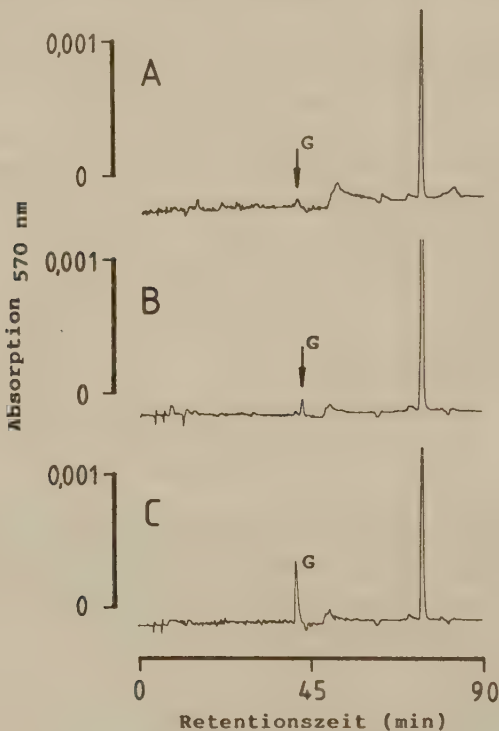


Abb. 20: Bestimmung des COOH-Terminus mit Carboxypeptidase Y aus Hefe. Die Analyse von aliquoten Teilen (20 nMol) des Ansatzes erfolgte zum Zeitpunkt 0 (A), nach 0,5 (B) und 3 stündiger Inkubation. G steht für Glycin.

Beide Bestimmungsmethoden belegten somit ein carboxyterminales Glycin. Darüber hinaus lassen die Daten der Hydrazinolyse den Schluß zu, daß sich am NH_2 -Terminus entweder Glutaminsäure bzw. Glutamin oder Cystein befinden.

det. Das Scheitern des Edmannabbaus, in dem keine Aminosäure abgespalten wurde, könnte durch eine intramolekulare Zyklisierung einer N-terminalen Glutaminsäure über die freie Amino- und γ -Carboxygruppe verursacht sein, wie bei Kollagen und Immunglobulinen (Podell und Abraham 1978), oder durch Methylierung bzw. häufiger Acetylierung des Aminoterminus. In all diesen Fällen liegt keine freie α -Aminogruppe vor und somit müßte das PC Ninhydrin negativ sein. Überraschenderweise reagierten die PC-Peptide mit dem Ninhydrinreagens zu dem charakteristischen, purpurfarbenen Farbkomplex, folglich mußte, wider Erwarten, eine freie Aminogruppe (die nicht die Amidgruppe von Glutamin sein konnte) vorhanden sein. Das bedeutete aber auch, daß Phenylisothiocyanat im Edmanabbau zwar mit der N-terminalen Aminosäure koppeln, aber nicht abspalten konnte.

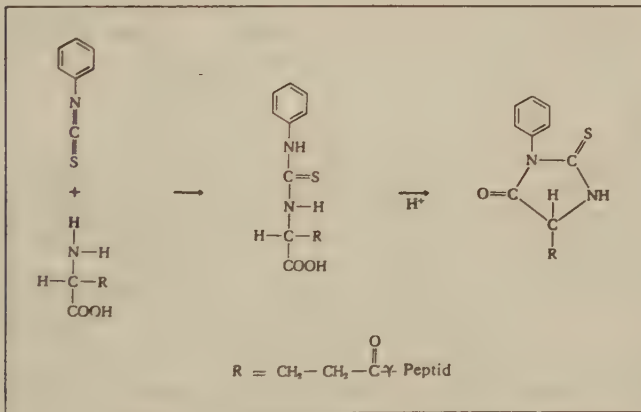


Abb. 21: Reaktion von Phenylsenföf mit einem γ -Glutamylpeptid
(nach Lehninger 1972, modifiziert)

Ein solches Verhalten ließ sich nur durch eine Glutaminsäure erklären, die über ihre γ -COOH-Gruppe die Peptidbindung bildet. Denn ein solcher Glutamylrest würde mit

Phenylisothiocyanat über die freie alpha-Carboxylgruppe zyklisieren, vergleichbar der Reaktion von Phenylsenföhl mit freien Aminosäuren (Lehninger 1972), ohne dabei die Peptidbindung zur nächsten Aminosäure zu spalten (Abb. 21). Diese Überlegung wurde durch Identifizierung einer aminoterminalen Glutaminsäure unterstützt. Der Nachweis konnte nach Markierung der N-terminalen Aminosäure des PC-Komplexes mit Sanger-Reagens (Dinitrofluorbenzol) und anschließender Hydrolyse durch Dünnschicht-chromatographische Bestimmung einer dinitrophenylierten Glutaminsäure geführt werden (Abb. 22). Der Beweis für die ungewöhnliche Peptidbindung ließ sich durch das Enzym γ -Glutamyltranspeptidase erbringen, das selektiv γ -Glutamylgruppen hydrolysiert oder, sind geeignete Akzeptor-

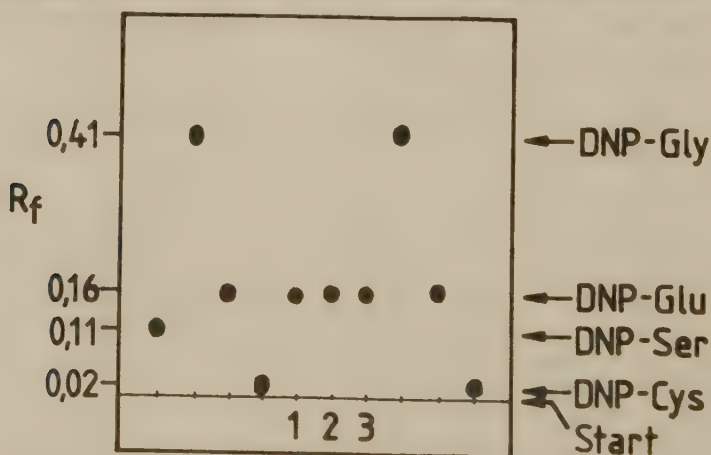


Abb. 22: Dünnschichtchromatographie der Dinitrophenyl-markierten, N-terminalen Aminosäure von Phytochelatin

Hydrolysate von dinitrophenylierten (DNP) Peptiden, 0,1 mg Glutathion (1), 0,4 mg PC-Komplex aus *R. serpentina* (2) und 0,1 mg alpha-Glu-Thr-Tyr (3), wurden in Chloroform/Eisessig/Wasser im Verhältnis 94/1/5 auf Kieselgelplatten chromatographiert. Als Referenz wurden DNP-Aminosäuren aufgetragen und deren Laufhöhe im Chromatogramm mit Pfeilen gekennzeichnet.

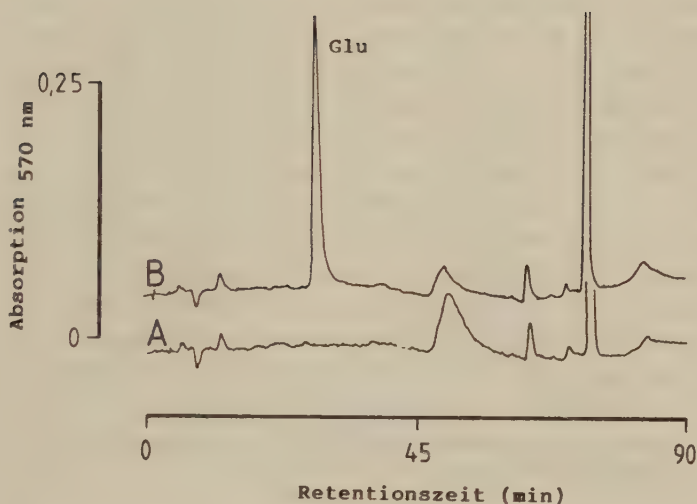


Abb. 23: Nachweis eines N-terminalen γ -Glutamylrestes in Phytochelatin. Aminosäurechromatogramm vor (A) und nach (B) Inkubation des S-benzylierten Peptids mit γ -Glutamyltranspeptidase.

Peptid	eingesetztes ^a Peptid (nMol)	freigesetzte ^b Glu (nMol)	Umsatz (%)
Phytochelatin ^c	7,9	7,8	99
Glutathion	5,0	5,1	102
α -Glu-Thr-Tyr	5,1	0,06	1

Tab. 10: Selektive Abspaltung von γ -Glutamylresten durch γ -Glutamyltranspeptidase

^a durch Hydrolyse und Aminosäure-Chromatographie bestimmt

^b durch Aminosäureanalyse quantifiziert

^c als S-benzyliertes Derivat des PC-Komplexes eingesetzt

moleküle wie Glutathion oder Diglycin vorhanden, übertragen kann (Connell und Adamson 1970). Die Ergebnisse zeigen eine eindeutige Freisetzung von Glutaminsäure nach Inkubation von PC und Enzym (Abb. 23). Wie eine Quantifizierung einer aliquoten Molmenge Peptid durch Bestimmung des Glycingehalts über Aminosäureanalyse ergab, lag der Umsatz bei 99% der eingesetzten Molmenge Peptid. In der Positivkontrolle, d.h. bei Glutathion konnte ein vergleichbarer Umsatz festgestellt werden. Dagegen konnte die Enzympräparation der γ -Glutamyltranspeptidase über die α -Carboxygruppe gebundene Glutaminsäure unter gleichen Bedingungen nur zu 1% hydrolysieren. Mit einer Meßtoleranz von etwa $\pm 5\%$ ist dieses Ergebnis als eine Spaltung von 1 Mol γ -Glutamylrest pro Mol PC-Peptid aufzufassen.

4.3. Enzymatisch-chemische Sequenzierung

Mit der Entfernung der N-terminalen, den Edmanabbau blockierenden Aminosäure sollte einer Peptidsequenzierung nichts mehr im Wege stehen. Und tatsächlich konnte die nachfolgende Aminosäure nach manuellem Edmanabbau, modifiziert von Chang (1983), als Cystein identifiziert werden, jedoch ließen sich weitere Aminosäuren nicht abspalten. Die Ursache dafür war wieder eine γ -Glutamylgruppe. Durch alternierenden Einsatz von γ -Glutamyltranspeptidase und manuellem Edmanabbau konnte die Sequenzbestimmung vorgenommen werden. Dabei erwies sich eine S-Benzylisierung der PC-Monomere als vorteilhaft, weil die Transpeptidase das modifizierte Substrat deutlich schneller umsetzte (etwa 50 x im Vergleich zu S-carboxymethyliertem).

Die Peptide a-e des Cd-Phytochelatin-Komplexes waren durch präparative HPLC isoliert worden (Abb. 24). In dieser PC-Präparation aus R. serpentina zeigte sich

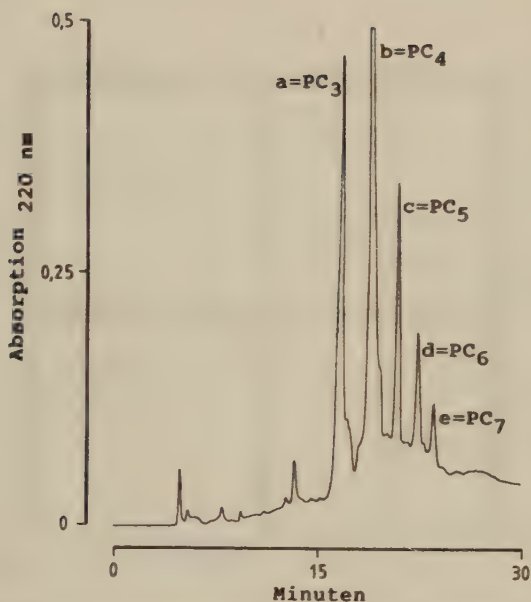


Abb. 24: Isolierung der Phytochelatinmonomere durch präparative HPLC. Fraktionen a-e wurden nach Sequenzierung als PC₃₋₇ bezeichnet.

Abbau- schritt	Abbau enzymatisch	chemisch	Amino- säure	Quantität (nMol)	Ausbeute (%)
1.	+	-	Glu	321	101,8
2.	-	+	Cys	-	-
3.	+	-	Glu	170	54,0
4.	-	+	Cys	-	-
5.	+	-	Glu	100	31,8
Restpeptid			Cys-Gly	93	29,0

Tab. 11: Enzymatisch-chemische Sequenzierung von S-benzyliertem PC₃ (Peptid a). Die eingesetzte Peptidmenge wurde durch Aminosäureanalyse eines aliquoten Teils des Ansatzes mit Leucin als innerem Standard bestimmt. Glutaminsäure und Restpeptid wurden über Aminosäureanalysator quantifiziert, Cystein durch Mikro-Dünnschichtchromatographie identifiziert (siehe B 6.3.2.).

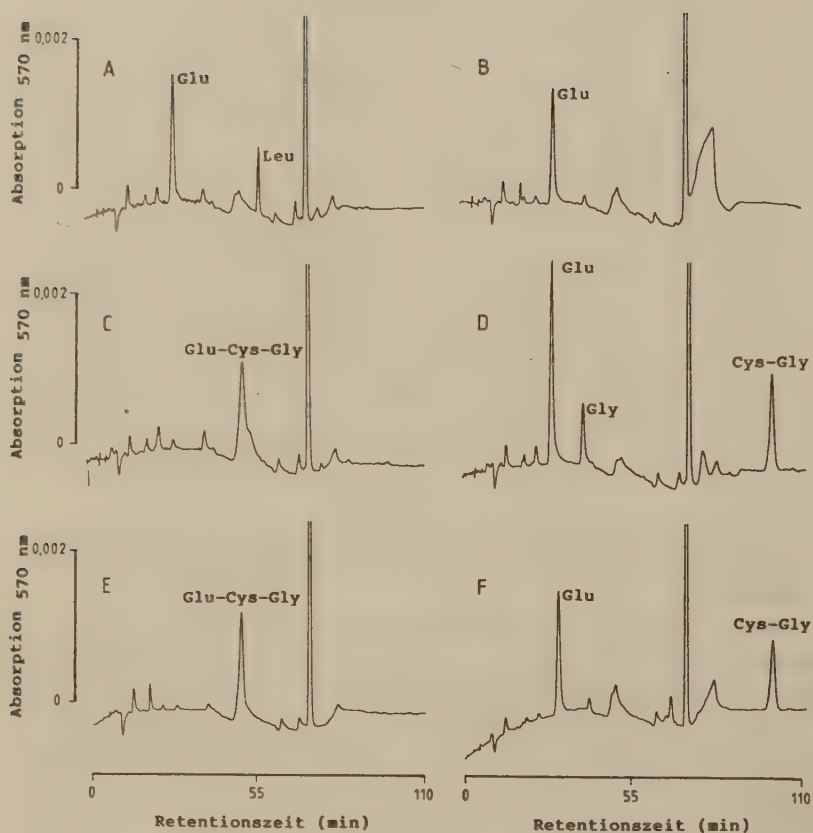


Abb. 25: Analyse der γ -Glutamylabspaltung der PC_3 -Sequenzierung Aliquote des Inkubationsansatzes mit γ -Glutamyltranspeptidase wurden chromatographiert: (A) 1., (B) 2., (C) vor der 3. und (D) 3. Abspaltung. In (C) ist das Restpeptid, S-benzyliertes Glutathion zu erkennen, welches in (E) als Referenz chromatographiert wurde. In (D) wurde das Tripeptid durch das Enzym in Glu und Cys-Gly hydrolysiert, identisch der Glutathionkontrolle (F). Leucin war als innerer Standard in (A) zugesetzt worden, in (D) wurde zum Teil Glycin freigesetzt.

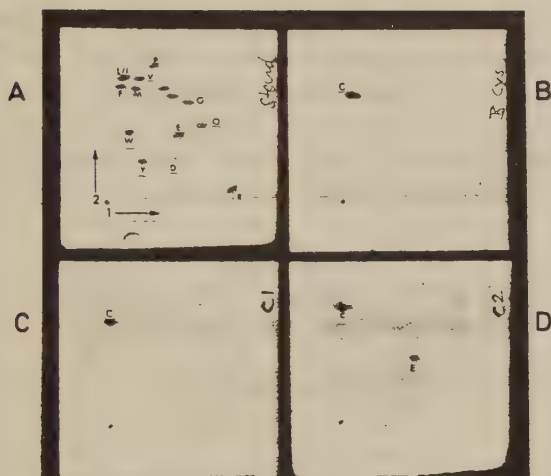
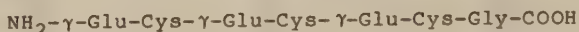


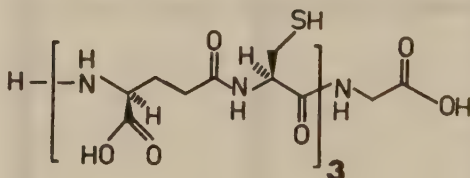
Abb. 26: Identifizierung der Thiohydantoinderivate der PC₃-Sequenzierung. Die Derivate der Standardamino-säuren (A) konnten eindeutig von S-Benzyl-Cysteinthiohydantoin (B) getrennt werden. In (C) und (D) sind die zweidimensionalen Chromatographien der Aminosäurederivate des 1. und 2. chemischen Abbauzyklus zu sehen. Etwa in der Mitte von (D) ist schwach die entsprechend derivatisierte Glutaminsäure zu erkennen. Eine schematische Darstellung von (A) wird in B 6.3.2. gezeigt.

Komponente b als die dominante Peptidfraktion im Unterschied zu Abb. 18; ein Hinweis auf durchaus differierende Monomierzusammensetzungen in verschiedenen PC-Isolaten. Peptid a stellte nach der UV-Absorption zu schließen die zweitgrößte Fraktion. Mit etwa 0,3 mg dieses Peptids konnten nach S-Benzylierung der Cysteine fünf Abbauschritte, drei mit Glutamyltranspeptidase (Abb. 25) und zwei durch chemische Spaltung (Abb. 26), durchgeführt werden. Nach der 3. enzymatischen Glutaminsäureabspaltung ließ sich neben Glutaminsäure das Dipeptid Cys-Gly mit entsprechend umgesetztem Glutathion als

Referenz im Aminosäurechromatogramm identifizieren (Abb. 25 C-F). Das Ergebnis der Sequenzierung faßt die Tabelle 11 zusammen. Damit besitzt das PC-Peptid folgende Primärstruktur:



oder:



Durch die repetitiven γ -Glutamylreste unterscheidet es sich grundsätzlich von anderen Peptiden oder Proteinen. Da solche Peptidbindungen nicht an Ribosomen gebildet werden, muß eine nichtribosomale Synthese des Peptids erfolgen, mit der weitreichenden Konsequenz, daß es dafür keine kodierende mRNA gibt, und damit kein Gen. Es unterscheidet sich unter diesem Aspekt fundamental von Metallothionein. Ein deutlicher Unterschied liegt auch in der Molekülgröße von 7 Aminosäuren des PC-Monomers, auf die bereits aus den Daten der Hydrazinolyse und Hydrolyse zu schließen war. Für Peptid b, der Hauptkomponente des PC-Komplexes, wurde in diesem Zusammenhang eine Sequenz aus 9 Aminosäuren postuliert. Die Bestimmung der Primärstruktur zeigte sich analog der von Peptid a; erforderte jedoch einen weiteren Abbauzyklus mit Transpeptidase und Edmanspaltung. Die Bilanz des Abbaus ist in Tab. 12 ersichtlich. In der Tat war es ein nonameres Peptid, mit einem Peptid a homologen Aufbau aus γ -Glu-Cys Einheiten und der Formel $(\gamma\text{-Glu-Cys})_4\text{-Gly}$. Aufgrund dieser Homologien wird dieses PC-Monomer als PC_4 und Peptid a als PC_3 bezeichnet, wobei der Index die Anzahl der (Glu-Cys)-Einheiten angibt. Diese Schreibwei-

Abbau- schritt	Abbau		identif.		Quantität		Ausbeute	
	enzym.	chemisch	Aminosr.		(nMol)		(%)	
			PC ₄	PC ₅	PC ₄	PC ₅	PC ₄	PC ₅
1.	+	-	Glu		358	188	97,7	104,2
2.	-	+	Cys		-	-	-	-
3.	+	-	Glu		229	105	62,5	58,1
4.	-	+	Cys		-	-	-	-
5.	+	-	Glu		101	65	27,5	36,1
6.	-	+	Cys		-	-	-	-
7.	+	-	Glu		53	31	14,4	17,3
Restpeptid			Cys-Glu	-	48	-	12,9	-
8.	-	+	-	Cys	-	-	-	-
9.	+	-	-	Glu	-	15	-	8,1
Restpeptid			-	Cys-Gly	-	8	-	4,5

Tab. 12: Enzymatisch-chemische Sequenzierung von PC₄ (Peptid b) und PC₅ (Peptid c). Legende wie in Tab. 11.

se bot sich deshalb an, weil Abbauversuche mit den anderen Peptiden c-e ebenfalls eine Primärstruktur bestehend aus (γ-Glu-Cys)-Dipeptiden erkennen ließen. Konnte für Peptid c mit 11 Aminosäuren die Sequenz noch ermittelt und als PC₅ bezeichnet werden (Tab. 12), gelang es nicht die Peptide d und e vollends in ihrer Struktur aufzuklären. Die Ursache dafür lag in den hohen Verlusten an Peptidmaterial von Abbaurunde zu Abbaurunde. Ungefähr 40% gingen pro Glu-Cys Bestimmung verloren. In erster Linie ist dies auf Extraktionsverluste während des Edmanabbaus zurückzuführen, aber auch in der nicht perfekten Umsetzung und Spezifität der verwendeten γ-Glutamyltranspeptidase, die trotz Optimierungsversuchen in geringem Maße, etwa 1-2%, C^α-Peptidbindungen hydrolysierte (siehe Abb. 25D, Glycinfreisetzung; vgl. Tab. 10). Da die abgespaltene Glutaminsäure wegen der Gefahr hoher Verluste an Peptidmaterial nicht aus dem Ansatz

für den Edmanabbau entfernt wurde, wurde sie ebenfalls mit Phenylisothiocyanat umgesetzt. Zwar konnte die durch die Derivatisierung hydrophob gewordene Glutaminsäure zum großen Teil vor der Spaltungsreaktion zusammen mit überschüssigem Reagens extrahiert werden, kleinere Mengen jedoch blieben im Ansatz zurück und ließen sich meist als Spuren neben dem Cysteinhydantoin identifizieren (in Abb. 26D zu sehen). Zudem bot die Sequenz mit alternierenden Glutamyl- und Cysteinylresten keinen Anhaltspunkt zu entscheiden, ob ein neu abgespaltenes Cystein und eine 'verschleppte' Glutaminsäure vorlag oder umgekehrt. Wenngleich die unterschiedlichen Intensitäten der Hydantoine eine Aussage ermöglichten, einen eindeutigen Schluß ließ erst die Quantifizierung der freigesetzten Glutaminsäure zusammen mit den Daten der Peptidhydrolyse zu. Um die aus dieser Sequenzierung gewonnen Ergebnisse zu bestätigen, aber auch, um längere Peptidketten sequenzieren zu können, wurde nach einer ergänzenden Methode zur Bestimmung der Primärstruktur von PC-Monomeren gesucht.

4.4. Sequenzbestimmung durch Partialhydrolyse

Um die Einschränkungen der enzymatisch-chemischen Methode zu umgehen, wurde ein Sequenzierverfahren ausgearbeitet, das auf der statistischen Spaltung der Peptidketten durch Säurekatalyse beruhte. Im wesentlichen wurden die einzelnen Peptide mit Perameisensäure oxidiert, am Aminotermius mit einer Dinitrophenylgruppe (DNP-Gruppe) markiert und partiell hydrolysiert. Die so erzeugten Bruchstücke wurden 2-dimensional getrennt. Fragmente mit einer DNP-Gruppe konnten als gelbe Flecke lokalisiert und nach Isolierung photometrisch quantifiziert werden. Die Aminosäurezusammensetzung dieser Fragmente in Relation zur Molmenge des jeweiligen DNP- Pep-

tids sollte Aufschluß über die Primärstruktur des eingesetzten PC-Monomers geben.

Mit 1 n HCl und 95°C für 18 Minuten konnten in Vorversuchen Bedingungen gefunden werden, die DNP-PC-Monomere statistisch nur etwa einmal spalten. Eine weitere Voraussetzung dieser Methode war die Trennung der partialhydrolysierten Peptidfragmente, die sich in der Hydrophobizität und Kettenlänge unterschieden. Nachdem die DNP-Bruchstücke durch ihren Glutaminsäure- und Cysteinsäuregehalt sehr hydrophil waren und die DNP-Gruppe die einzig hydrophobe Komponente darstellte, sollte ein geeignetes organisches Laufmittel die Fragmente nach Kettenlänge trennen. Gute Trennung zeigte das Laufmittel n-Propanol:30% Ammoniak:Wasser im Verhältnis 50:15:10. Ein zweites Trennsystem sollte sich die Ladungsunterschiede zu Nutze machen. Zwar sind Glutaminsäure- und Cysteinsäurereste beides saure Peptidkomponenten, unterscheiden sich aber im pK-Wert. Die Carboxylgruppe besitzt einen pK-Wert von etwa 2,2, die Sulfonsäuregruppe unter 1. Deshalb sollten in einem Puffer von pH 1,9 (Wasser: Ameisensäure;Eisessig, 854:26:120) überwiegend nur die modifizierten Cysteine dissoziiert vorliegen, und somit im elektrischen Feld die DNP-Peptide gemäß ihrer Mobilität, als Ausdruck von Peptidlänge und Sulfonsäuregehalt, wandern. Die Chromatographie auf Kieselgel-Dünnschichtplatte von partialhydrolysiertem DNP-PC₃ wird in Abb. 27 gezeigt. Die Trennung lieferte 6 gelbe 'Spots', aus denen mit 50% ethanolischer Lösung die jeweiligen DNP-Peptidfragmente eluiert wurden. Nach photometrischer Bestimmung der DNP-Konzentration erfolgte die Hydrolyse und anschließende Aminosäureanalyse der Peptide. Die Ergebnisse in Tab. 14 bestätigen die Trennung der Fragmente nach Kettenlänge und Cysteinsäuregehalt, jedoch konnten das intakte DNP-PC₃ und die um Glycin verkürzte Kette nicht voneinander getrennt werden. Der von oben nach unten gezählte 6.Fleck setzt sich somit aus dem

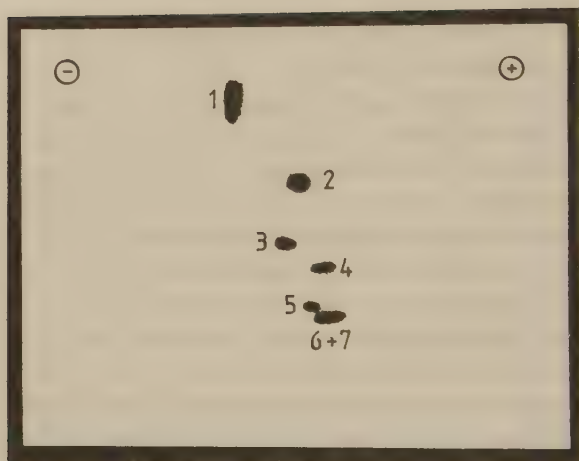


Abb. 27: 'Fingerprint' von Phytochlatin-Monomer PC_3 .

Aufgrund zu geringer Unterschiede in der Mobilität und Hydrophilie konnten das ungespaltene PC und die um Glycin gekürzte Kette nicht voneinander getrennt werden, sondern erschienen als zwei überlappende Flecken, 6+7. Die DNP-Peptide 1-7 wurden isoliert und analysiert (siehe Tab. 14). Der Start ist durch einen Kreis markiert, der Front entspricht der obere Bildrand (siehe Abb 28).

DNP-Peptid	Extinktion 360 nm	rel. Aminosr.gehalt nMol/0,05 E ₃₆₀			Ganzzahliges Verhältnis			Sequenz
		Glu	Cys	Gly	Glu	Cys	Gly	
1	0,093	0	0	0	0	0	0	Glu ^a
2	0,035	0	4,5	0	0	1	0	Glu-Cys
3	0,084	4,0	4,8	0	1	1	0	Glu-Cys-Glu
4	0,055	3,8	8,1	0	1	2	0	(Glu-Cys) ₂
5	0,060	7,9	9,2	0	2	2	0	(Glu-Cys) ₂ Glu
6+7	0,135	8,5	14,3	2,6	2	3	0,6	(Glu-Cys) ₃ + PC ₃

Tab. 14: Aminosäurezusammensetzung der DNP-Fragmente von PC_3

Aus dem Chromatogramm in Abb. 27 wurden die DNP-Fragmente, von oben

nach unten numeriert, isoliert und in 0,5 ml ethanolischer Lösung aufgenommen. Nach Bestimmung der Extinktion bei 360 nm (1 cm Lichtweg) wurde die Aminosäurezusammensetzung der Peptide analysiert. ^a DNP-Glu erscheint nicht auf dem Aminosäurechromatogramm und wurde deshalb nicht im Verhältnis der einzelnen Aminosäuren berücksichtigt.

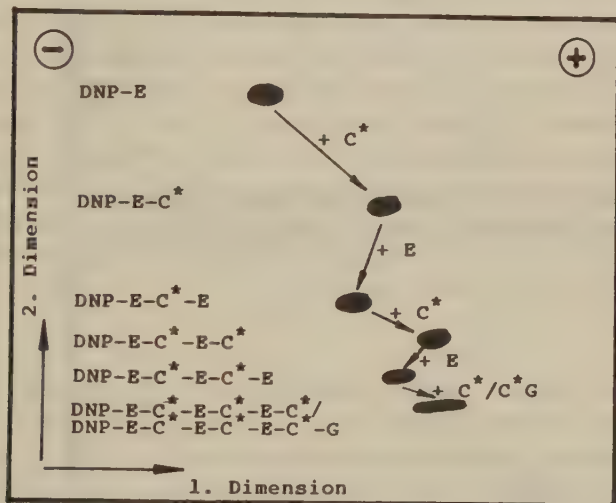


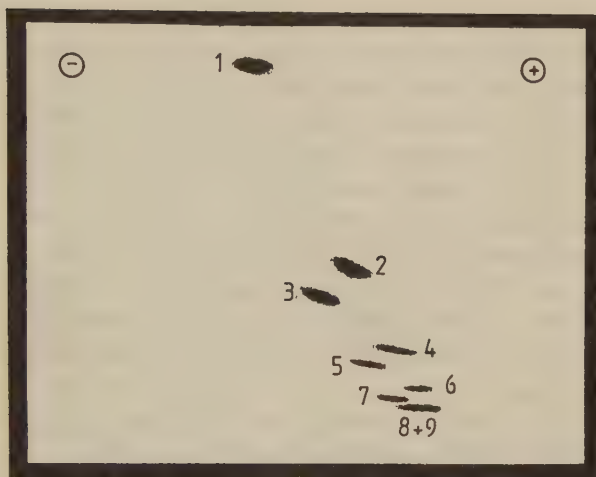
Abb. 28: Schematisches DNP-Peptidmuster von PC₃ nach zweidimensionaler Trennung.

Die Aminosäuren wurden mit E für Glutaminsäure, C* für Cysteinsäure und G für Glycin abgekürzt. Das DNP-Peptid wurde partial-hydrolysiert (1 N HCl, 95°C, 18 Min.) und anschließend zweidimensional getrennt. In der 1. Dimension erfolgte eine Elektrophorese (20 V/cm, 1h) auf Dünnschichtplatte (Kieselgel) mit Puffer, pH 1,9 (Wasser:Ameisensäure:Eisessig, 854:26:120). In der 2. Richtung wurde mit Laufmittel n-Propanol:30% Ammoniak (w/v):Wasser, im Verhältnis 50:15:10 chromatographiert. Nach Hydrophobie der einzelnen Fragmente wurde in der 2. Dimension unterschieden, im elektrischen Feld nach Mobilität. Von oben nach unten zählend läßt sich die Kettenlänge eines DNP-Fragments

ablesen, da auf Hydrophobizität, d.h. Peptidgröße chromatographiert wurde. DNP-Glu besitzt den größten R_f -Wert, das Dipeptid mit einer zusätzlichen Cysteinsäure einen etwas geringeren, muß aber aufgrund der neuen negativen Ladung weiter zur Anode gewandert sein, also rechts unterhalb von DNP-Glu liegen. Das Tripeptid mit einer weiteren, carboxyterminalen Glutaminsäure weist einen noch geringeren R_f -Wert auf und wegen dieser nahezu undissoziierten Aminosäure auch eine geringere Mobilität als das Dipeptid, somit muß es sich links unterhalb von DNP-Glu-Cys befinden. Das nachfolgende Peptidbruchstück trägt eine zweite Cysteinsäure, wird somit wieder näher zur Anode plaziert sein. Auf diese Weise ergibt sich eine Zick-Zack Anordnung, bei der mehr anodisch orientierte DNP-Peptide am Carboxyterminus eine zusätzliche Cysteinsäure erhalten oder eine Glutaminsäure verloren haben. Das intakte DNP-Peptid und DNP-PC ohne Glycin konnten nur unvollständig getrennt werden.

Gemisch beider Peptide zusammen. Mit diesem Experiment konnte die Primärstruktur von PC_3 bestätigt werden, gleichzeitig dokumentierte es eine eindeutige Differenzierung zwischen den einzelnen Glutamin- und Cysteinsäurehaltigen Peptiden, deren Sequenz durch simples 'Lesen' des Chromatogramms zugänglich ist. Eine schematische Darstellung der DNP-PC-'Fingerprints' und ihre Interpretation ist in Abb. 28 präsentiert. Nach dieser Methodik wurden die Primärstrukturen von PC_4 und PC_6 (Peptid d der Abb. 24) bestätigt bzw. abgeleitet (Abb. 29A, 29B). Waren für die enzymatisch-chemische Sequenzierung von PC-Monomeren mehrere Tage erforderlich, so werden mit dieser Partialhydrolyse weniger als zwei benötigt. Jedoch kann keine Aussage über die Art der Glutamylobindung getroffen werden. Die enzymatisch-chemische Methode konnte in 5 Abbauzyklen die γ -Glutamylobindung der Peptide c-e (Abb. 24) nachweisen, der 6. Glutamyrest von PC_6 wurde somit nicht charakterisiert. Erst durch Iso-

A



B

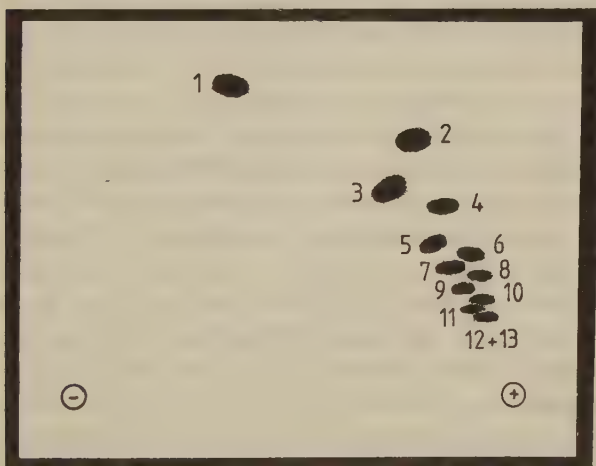


Abb. 29: 'Fingerprint' von Phytochelatin-Monomer PC_4 (A) und PC_6 (B). Die einzelnen DNP-Peptidfragmente wurden fortlaufend, ihrer Kettenlänge entsprechend nummeriert. Die Peptide 8+9 bei PC_4 und 12+13 bei PC_6 , also das nicht hydrolysierte DNP-Peptid und die um Glycin verkürzte Kette konnten nicht getrennt werden. Das Chromatogramm von PC_6 wurde der besseren Trennung halber zweimal chromatographiert. Nähere Erklärung ist auch dem Text in der Abb. 28 zu entnehmen.

lierung carboxyterminaler Fragmente aus dem Chromatogramm von partialhydrolysiertem DNP-PC₆ und deren enzymatisch-chemischem Abbau konnte die γ -Glutamylbindung verifiziert werden. Dazu wurde das Chromatogramm von Abb. 29B mit Fluorescamin besprüht, um freie Aminotermi- ni zu detektieren. Es konnten 5 stark im UV-Licht fluo- reszierende Flecken isoliert und auf ihren Glycingehalt, als Zeichen eines carboxyterminalen Peptidbruchstückes, geprüft werden. Zwei davon enthielten Glycin und eine zweite Aminosäureanalyse dieser Peptide nach voran- gegangener Dinitrophenylierung belegten die Sequenzen Cys-Gly und Cys-Glu-Cys-Gly. Aus dem tetrameren Peptid konnte nach Edmanabbau des Cys-Restes mit γ -Glutamyl- transpeptidase ein γ -Glutamylrest abgespalten werden. Damit ist auch dieses Peptid als homologes PC-Monomer der allgemeinen Strukturformel $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ charak- terisiert worden. Ein pentameres PC-Peptid ($n=2$) konnte aus der in Abb. 30 durch HPLC aufgetrennten Präparation isoliert und eindeutig als PC₂ sequenziert werden. Im Unterschied zu den vorangegangenen Isolationen war die für diese PC-Reinigung verwendete Zellsuspensionskultur von R. serpentina bereits zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase mit Cd belastet worden. Daß die Wachs- tumsphase tatsächlich Einfluß auf die Gehalte der Zelle an den verschiedenen PC-Monomeren besitzt, wurde später eingehender untersucht (vgl. C 6.2.). Es konnten sogar Bedingungen gefunden werden, unter denen überwiegend PC₂ synthetisiert wird (vgl. C 5.2., 5.3.), und damit je nach Zeitpunkt und Grad der Schwermetallbelastung PC₂, PC₃ oder PC₄ die Hauptkomponente des PC-Isolats stellen kann (vgl. Abb. 24 und 30). Mit PC₂ schließt sich eine lineare Reihe polymerer γ -Glutamylcysteinyl-Peptide, die von Glutathion, $n=1$, bis PC₆ reicht. Mit noch höheren Polymeren im PC-Komplex war zu rechnen. Die Hydrolyse der im Chromatogramm von Abb. 30 als 7-11 bezeichneten Peptide ergab in allen Fällen annähernd 50 Mol% Glu und

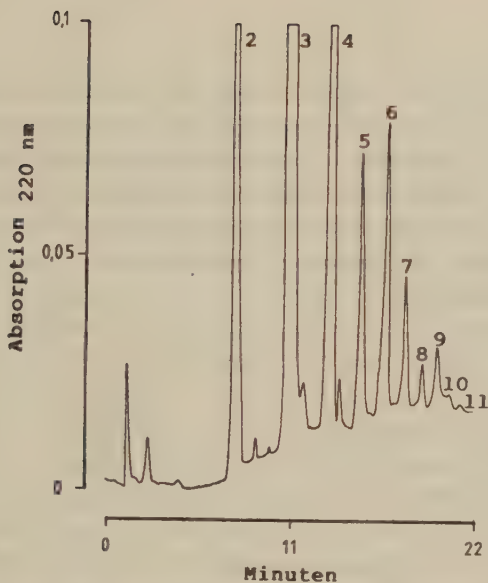


Abb. 30: HPL-Chromatogramm von Phytochelatin isoliert aus R. serpentina. Die Zahlen 2-11 kennzeichnen fortlaufend nur Glu-, Cys- und Gly-haltige Peptide. Peptide 2-6 entsprechen PC₂₋₆. Das Phytochelatin war aus Zellsuspensionskulturen isoliert worden, die zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase (2 Tage nach Überimpfen) mit 300 µM Cd(NO₃)₂ für 4 Tage belastet waren.

Cys und etwa 6 Mol% Gly. Enzymatisch-chemische Abbauprobungen belegten nach Ansequenzieren der Peptide einen PC-typischen Aufbau aus γ-Glu-Cys Einheiten, jedoch gelang die komplette Sequenzierung mit beiden zur Verfügung stehenden Methoden nicht. Wenngleich aufgrund dieser Ergebnisse kaum Zweifel an einer PC-homologen Struktur bestanden, konnte keine Aussage über die Kettenlänge dieser PC-Monomere gemacht werden. Die Daten der Aminosäureanalyse waren wegen der Meßtoleranzen viel zu ungenau. Jedoch eröffnete die HPLC der Peptide einen Weg, die Peptidlänge zu bestimmen. Denn die Wechselwirkung eines Peptids mit dem Säulenmaterial während der HPLC ist nach O'Hare und Nice (1979) eine Funktion der einzelnen Aminosäuren des Peptids. Jeder Aminosäure kann unter defi-

nierten Chromatographiebedingungen eine Retentionskonstante D zugeordnet werden, so daß die Retention T_R des Peptids sich aus der Summe der einzelnen Retentionsbeiträge der Aminosäuren ableiten läßt. Dabei steigt die Retention nicht linear mit der Kettenlänge im linearen Elutionsgradienten an, sondern logarithmisch. Nach Sasagawa et. al (1982) gilt:

$$T_R = a \cdot \ln (1 + \sum_j D_j \cdot n_j) + C$$

In dieser Formel bezeichnet a einen konstanten Faktor, D_j die Retentionskonstante der Aminosäure j und n_j deren Anzahl. C stellt die 'Leerzeit' der Chromatographie dar, also die Zeit, die eine nicht mit dem Säulenmaterial interagierende Substanz von der Injektion bis zur Detektion benötigt. Glutathion und PC_2 unterscheiden sich in ihrer Sequenz nur in einer (Glu-Cys) Einheit. Somit ist der Unterschied in der Retentionszeit beider Substanzen, aber auch der anderer PC-Monomere, auf die zusätzlichen Dipeptidylreste zurückzuführen. Damit gilt, abgeleitet aus der oben genannten Formel für die Retentionsdifferenz von Glutathion und PC_n :

$$T_{R-PCn} - T_{R-GSH} = a \cdot \log n \quad (n = 1, 2, 3, 4, \dots)$$

Die Retentionszeiten der PC-Monomere T_{R-PCn} sind dem Chromatogramm mit linearem Acetonitrilgradienten (1% Acetonitril pro Minute) in Abb. 30 entnommen, die für Glutathion T_{R-GSH} wurde mit 2,38 Minuten bestimmt. In Abb. 31 wurde die Differenz $T_{R-PCn} - T_{R-GSH}$ gegen den Logarithmus der Anzahl n an Glu-Cys-Einheiten aufgetragen. Es resultierte eine Gerade, aus deren Steigung sich Faktor a mit $a=18,47$ Minuten berechnen ließ. Für die Retentionszeit von PC_n , T_{R-PCn} , lautet daher die Geradengleichung:

$$T_{R-PCn} = 18,47 \text{ min} \cdot \log n + 2,38 \text{ min}$$

Mit dieser Gleichung konnten nun die Retentionszeiten aller PC-Monomere bestimmt werden und, wie ein Vergleich der gemessenen und berechneten Werte von PC₂₋₆ belegte, mit einer Abweichung in der Regel unter 1% (Tab. 15). Damit erlaubt diese Methode die eindeutige Bestimmung der Anzahl an Glu-Cys Einheiten im PC-Monomer. Für höhere PC-Homologe, PC₇₋₁₁, errechnete Retentionszeiten deckten sich perfekt mit den gemessenen

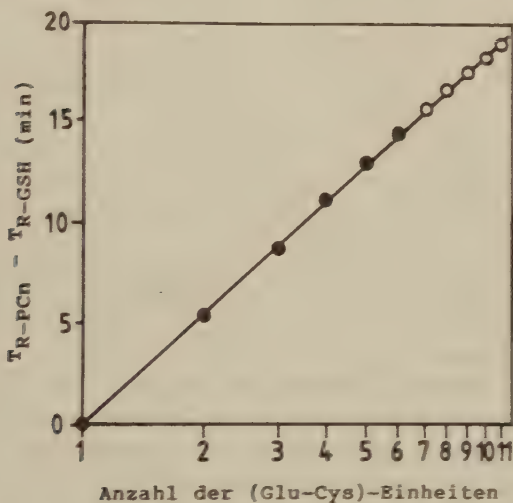


Abb. 31: Abhängigkeit der Retentionszeit von PC-Peptiden von der Anzahl an Glutamylcysteinyl-Einheiten. Im Diagramm wurde die Differenz der Retentionszeit von PC-Peptiden gegenüber Glutathion in Abhängigkeit von der Anzahl an Glu-Cys-Einheiten im PC-Molekül aufgetragen. Mit geschlossenen Symbolen sind die Werte für die sequenzierten Peptide PC₂₋₆ eingetragen, mit offenen Kreisen die der Peptide 7-11 aus Abb. 30, identisch den errechneten für PC₇₋₁₁ (vgl. Tab. 15). Die Retentionszeit von Glutathion, T_{P-GSH} , wurde mit 2,38 Minuten bestimmt.

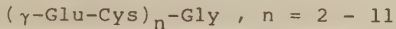
PC _n (Glu-Cys) _n Gly	Retentionszeit		Abweichung (%)
	gemessen (min)	errechnet (min)	
1	2,38	---	---
2	7,83	7,94	1,4
3	11,15	11,19	0,3
4	13,58	13,50	0,6
5	15,40	15,29	0,7
6	16,86	16,75	0,6
7	18,05 ^a	17,99	0,3
8	19,06 ^a	19,06	0
9	19,93 ^a	20,00	0,4
10	20,66 ^a	20,85	0,9
11	21,34 ^a	21,61	1,3

Tab. 15: Retentionszeiten der PC-Monomere in der HPLC mit linearem Acetonitrilgradienten (siehe Text)

^a Es wurden die Retentionszeiten der Peptide 7-11 (Abb. 30) für PC₇₋₁₁ eingesetzt.

Werten der Peptide 7-11 der Abb. 30 (Tab. 15, in Abb. 30 mit offenen Kreisen eingezeichnet). Daß es sich in der Tat um PC-Monomere handelte, war bereits aus deren Aminosäureanalyse und Ansequenzieren der Peptide zu schließen gewesen, wenngleich der polymere Aufbau aus (γ-Glu-Cys) Einheiten nicht vollständig belegt werden konnte. Theoretisch sollte dies durch Trypsinverdau der Peptide nach vorangegangener Aminoethylierung der SH-Gruppen (Smith 1967) oder durch einen carboxyterminalen Aminosäureabbau mit Ammoniumthiocyanat (Stark 1972) möglich sein, da in beiden Fällen die PC-Moleküle ausschließlich in identische Dipeptide und freies Glycin zerfallen müßten, die wiederum mit bekannten Methoden erfaßt werden können. In der Praxis ist aber mit einer nicht vollständigen Reaktion und Derivatisierung zu rechnen und damit mit einer

nicht überschaubaren Palette an Fragmenten, die eine eindeutige Aussage zunichte macht. Jedoch dokumentierten nicht nur die enzymatisch-chemischen Sequenzierungen die poly (γ -Glutamylcysteinyl)-Glycin Struktur, sondern auch Untersuchungen zur PC-Biosynthese erbrachten Evidenzen eines generellen Aufbaus der PC-Moleküle aus (γ -Glu-Cys) Einheiten (C 7.). Somit lautet die Strukturformel der bislang identifizierten Phytochelatine:



4.4 Nonameres Phytochelatin

Das nonamere Phytochelatin PC₄, als dominantes Peptid aus dem Cd-Komplex durch HPLC präpariert, sollte zur Abrundung der Befunde mit synthetischem PC₄ verglichen werden. Die Synthese wurde von Frau Dr. S. Modrow (Pettenkofer Institut, München) nach der Methode von Merrielfield durchgeführt, wofür ich mich an dieser Stelle vielmals bedanken möchte. Die Sequenzierung durch Partialhydrolyse lieferte eine identische Zick-Zack Anordnung der DNP-Peptide beider Proben. Reduktion des synthetisierten Phytochelatins mit Natriumborhydrid und anschließende Cd²⁺-Zugabe unter anaeroben Bedingungen führten zu einem Cd-Komplex, der sich weder im UV-Absorptionsspektrum noch während der Gelfiltration mit Sephadex G-50 von nativ isoliertem Cd-PC-Komplex unterschied (vgl. C 2., C 3.1.). Lediglich ein höherer Cd-Gehalt von 18,7 Gewichtsprozent der rekonstituierten Probe war gegenüber dem aus R. serpentina isolierten PC-Komplex mit durchschnittlich 14,5 Gewichtsprozent festzustellen. Aus dem Metallgehalt der rekonstituierten Probe läßt sich ein Cd:SH-Verhältnis von 1:1,95 bestimmen. Als Schlußstrich unter Isolation und Sequenzbestimmung von PC₄ aus R. serpentina erfolgte die Elementar-

analyse. Von Milligramm-Mengen des nonameren Peptids wurde die elementare Zusammensetzung (C, H, O, N und S) im analytischen Labor Pascher, Bonn, bestimmt. Alle Analysenwerte für die Elemente der Summenformel von $\text{PC}_4\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_{18}\text{N}_9\text{S}_4$ waren in guter Übereinstimmung mit den theoretischen Werten (Tab. 16).

Element	C	H	O	N	S
theoretisch	40,67	5,28	28,71	12,56	12,78
gefunden	40,41	5,14	29,06	12,63	12,75
Abweichung (%)	0,6	2,3	1,2	0,6	0,2

Tab. 16: Elementaranalyse von PC_4 durchgeführt von der Fa. Pascher, Bonn. Die Angaben sind in Gewichtsprozenten.

5. Phytochelatin als Schwermetall-bindendes Prinzip höherer Pflanzen

Phytochelatin konnte als die induzierbare Cd-bindende Substanz in Zellkulturen von R. serpentina erkannt und charakterisiert werden. Beide Eigenschaften von PC, die Cd-abhängige Induktion und die Komplexbildung des Schwermetalls, ließen auf eine Funktion der Peptide in der Cd-Entgiftung dieser Pflanze schließen. Inwieweit es sich hier um einen artspezifischen oder weit verbreiteten Mechanismus der Cd-Bindung handelte, war an Pflanzen unterschiedlicher systematischer Ordnungen zu prüfen. Die Cd-Bindung erfolgt im PC-Komplex über Thiolgruppen, die auch andere Schwermetalle komplexieren, generell solche deren Sulfid in der Natur vorkommt. Nachdem Pflanzen an ihren Standorten mit verschiedenen Schwermetallen konfrontiert werden können, z.B. auf Galmeiböden mit Zink, Blei und Kupfer, drängte sich die Frage auf, induzieren auch andere Schwermetalle neben Cadmium PC und werden diese von den neusynthetisierten Peptiden gebunden. Diese Fragestellungen sollten aus Gründen der besseren Handhabung mit Zellsuspensionskulturen untersucht werden, streng genommen, ist damit eine Relevanz der Ergebnisse für differenzierte Pflanzen nicht zu zeigen. Denkbar wäre jedenfalls, daß Zellkulturen ein genetisch potentiell vorhandenes, Cd-bindendes Protein aufgrund ihrer weitgehenden Dedifferenzierung nicht exprimieren, zumal aus mehreren differenzierten Pflanzen ein MT-ähnliches Protein von ca. 10 kDa isoliert worden war (Bartolf et al. 1980, Rauser und Curvetto 1980, Wagner und Trotter 1982, Wagner 1984). Deshalb sollte auch die zelluläre Cd-Verteilung und -Bindung in intakten Pflanzen untersucht werden. Zur zuverlässigen Identifizierung von PC mußte anfänglich das Peptidmaterial jeweils isoliert und charakterisiert werden, später stand mit dem PC-Schnelltest (B 7) eine wirkungsvolle

Nachweismethode zur Verfügung, die umfangreichere Untersuchungen gestattete.

5.1. Induktion von Phytochelatin in verschiedenen pflanzlichen Zellkulturen mit Cadmium

Zellsuspensionskulturen der dikotylen Pflanzen Silene cucubalus und Rosa canina und der Monokotyle Dioscorea composita wurden analog R. serpentina 5 Tage durch Zugabe einer sterilen Cd-Lösung mit 200 μM CdSO_4 belastet. Aus dem geernteten Gewebe konnte ein Cd bindendes Material nach der Methode der PC-Reinigung mit einer durchschnittlichen Ausbeute des im Rohextrakt befindlichen Cd von 50-55% isoliert werden (Tab. 17).

	<u>Silene</u>	<u>Rosa</u>	<u>Dioscorea</u>	<u>Rauvolfia</u> ^a
Gewebe (TG)	19,8 g	23,8 g	16,7 g	10,5 g
Cd-Gehalt (mg/%):				
Rohextrakt	15,9/100	22,6/100	12,5/100	18,6/100
DEAE-Eluat	13,6/ 86	18,2/ 81	10,2/ 82	17,6/ 95
Salzfällung	11,8/ 74	16,1/ 71	9,1/ 73	16,4/ 88
Ultrafiltr.	8,9/ 56	14,4/ 64	7,6/ 61	14,0/ 75
Gelfiltrat. ^b	7,1/ 45	13,2/ 58	6,7/ 54	11,1/ 60

Tab. 17: Cadmiumbilanz der Phytochelatinisolierung aus Zellsuspensionskulturen von Silene cucubalus, Rosa canina und Dioscorea composita. Aus 5 Tage mit 200 μM CdSO_4 belasteten Kulturen wurde das Cd-bindende Material, wie unter B 4.1.-4.5. beschrieben, isoliert.

^a Werte sind vergleichshalber aus Tab. 3 entnommen

^b Proteinbestimmung nach Bradford (1976) ergab Werte unter 50 μg Protein, während das salzfreie Lyophilisat der Präparation aus Silene 37 mg, aus Rosa 71 mg und Dioscorea 38 mg wog.

Die Cd-Ausbeuten entsprachen in etwa der für die PC-Isolierung aus R. serpentina (vgl. C 2). Daß es sich bei den Cd-Komplexen wirklich um Phytochelatin handelte, erhärtete deren Aminosäureanalyse. Wieder konnten im Hydrolysat der Isolate nur die Aminosäuren Glu, Cys und Gly in substantiellen Mengen nachgewiesen werden (Abb. 32), wobei nicht nur die qualitative Zusammensetzung mit PC aus R. serpentina übereinstimmte, sondern auch die Verhältnisse der einzelnen Komponenten zueinander

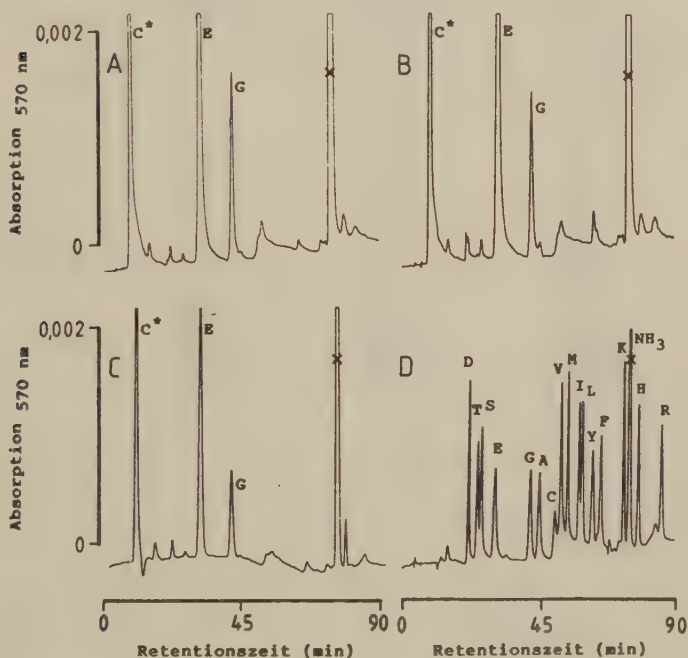


Abb. 32: Chromatogramme der Aminosäureanalysen der PC-Isolate aus Cd-belasteter Silene cucubalus (A), Rosa canina (B) und Dioscorea composita (C). In (D) ist ein Aminosäurestandard gezeigt mit 2,5 nMol pro Aminosäure. C* bezeichnet Cysteinsäure, E Glutaminsäure und G Glycin. Weitere Symbole sind dem Appendix Abkürzungen zu entnehmen.

	<u>Silene</u>	<u>Rosa</u>	<u>Dioscorea</u>	<u>Rauvolfia</u> ^a
Glutamat ^b	43,9	42,8	46,4	44,9
Cystein ^c	44,4	46,6	41,1	44,7
Glycin	11,7	10,6	12,5	10,4

Tab. 18: Aminosäurezusammensetzung der Cd-Phytochelatin Komplexe isoliert aus Angiospermen (in Molprozent)

^a Werte zum Vergleich aufgeführt, aus Tab. 6 unter C 3.4.

^b Summe von Glutaminsäure und desamidiertem Glutamin

^c als Cysteinsäure bestimmt

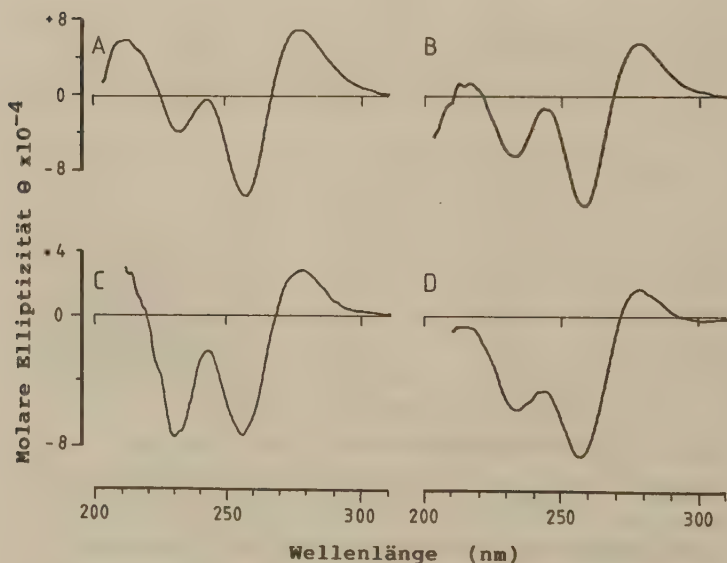


Abb. 33: Vergleich der CD-Spektren von Cd-Phytochelatin isoliert aus S. cucubalus (A), R. canina (B), D. composita (C) und aus R. serpentina (D). Bedingungen wie in Abb. 12., C 3.1..

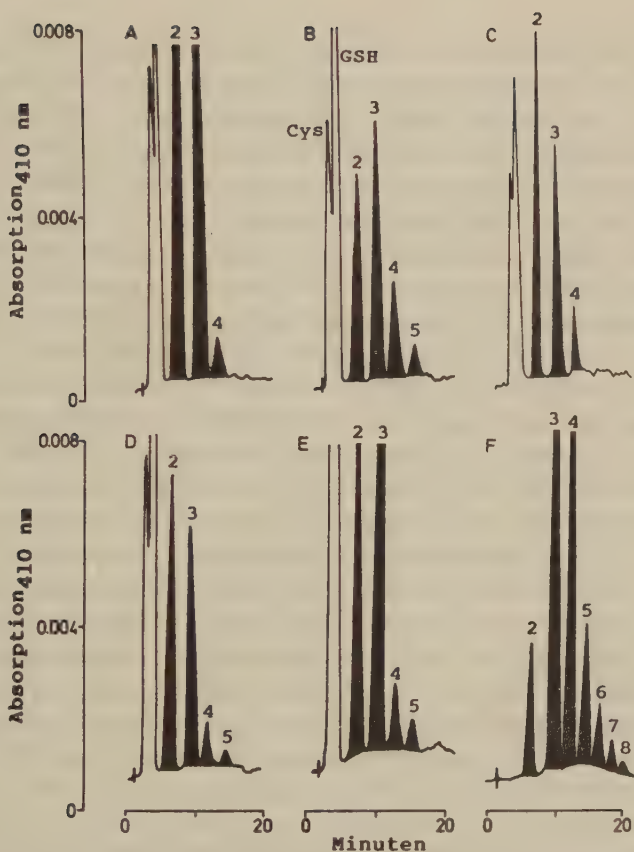


Abb. 34: Phytochelatininduktion in monokotylen Angiospermen und Gymnospermen durch Cadmium. Cd-exponierte Zellsuspensionskulturen von Secale cereale (A), Zingiber officinalis (B), Agrostis tenuis (C), Abies grandis (D) und Picea abies (E) wurden mit HPLC und Nachsäulenderivatisierung mit Ellman-Reagens auf PC-Synthese untersucht. In (F) ist ein Elutionsprofil von isoliertem PC aus R. serpentina gezeigt. Die Zellsuspensionen waren in Zn- und Cu-freiem Medium kultiviert worden. In Chromatogrammen dieser Kulturen ohne Cd-Belastung konnte kein PC nachgewiesen werden. Die einzelnen PC_n-Monomere sind schwarz dargestellt und mit ihrer Indexzahl n versehen. Zu Beginn des Gradienten eluierten Cystein ($T_{R-Cys}=2,5$ Min.) und nicht vollständig getrennt Glutathion ($T_{R-GSH}=3,0$ Min.).

(Tab. 18). Ebenso zeigte sich im CD-Spektrum kein signifikanter Unterschied (Abb. 33). Die Beweiskette für PC schloß der Versuch, das Isolat aus R. canina im Edmanabbau zu sequenzieren. Wie erwartet, konnte erst nach enzymatischer Hydrolyse einer N-terminalen γ -Glutamylgruppe ein Cysteinderivat abgespalten werden. Eine schnellere PC-Identifizierung erlaubte die HPLC-Trennung unter metalldissoziierenden Bedingungen mit spezifischer Detektion von SH-haltigen Molekülen. Dazu wurden durch Ansäuern weitgehend entproteinisierte Zellextrakte auf einer analytischen 'reversed phase'-Säule chromatographiert und das Eluat mit Ellman-Reagens derivatisiert. Um Ellman-positive Fraktionen zu erfassen, wurde das Eluat in einem Durchlaufphotometer bei 410 nm gemessen. Als Kriterium für einen positiven PC-Nachweis wurde nicht nur die Schwermetall-abhängige Induktion eines SH-haltigen Moleküls mit PC-identischer Retentionszeit herangezogen, sondern auch die gleichzeitige Neusynthese verschiedener PC-Monomere. Mit dieser Methode konnten Suspensionskulturen der Monokotylen Secale cereale, Zingiber officinalis und Agrostis tenuis und der Gymnospermen Abies grandis und Picea abies untersucht werden. In allen Fällen zeigte sich eine klare Induktion von PC-Monomeren, meist PC₂₋₄ nach Cd-Exposition (34 A-E). In unbelasteten Kontrollen konnte kein PC nachgewiesen werden. Da in allen untersuchten Zellkulturen der höheren Pflanzen eine PC-Induktion nachgewiesen werden konnte, sind offensichtlich Phytochelatine generell in Zellkulturen von Angio- und Gymnospermen zu finden.

5.2. Induktion mit verschiedenen Schwermetallen

Eine ubiquitäre Induzierbarkeit von Phytochelatin in höheren Pflanzen sollte ein Zeichen wichtiger zellulärer Funktion sein, möglicherweise einer dem Metallothionein

analogen Aufgabe in der Schwermetalldetoxifikation. Eine solche Überlegung ist nur aufrecht zu erhalten, wenn PC auch durch andere Schwermetalle wie Zink, Kupfer oder Quecksilber induziert wird. Aus diesem Grund wurde die PC-Induktion durch verschiedene Metallsalze überprüft. Sollte PC einen effektiven Schutzmechanismus vor toxischen SM-Ionen darstellen, müßte eine schnelle Neusynthese der metallbindenden Peptide stattfinden. Deshalb wurde auch der zeitliche Verlauf der PC-Biosynthese nach Schwermetallbelastung verfolgt.

Da die einzelnen Schwermetallsalze drastische Unterschiede (mehrere Zehnerpotenzen) in ihrer Toxizität gegenüber den Pflanzenzellen zeigten, war es nicht sinnvoll die PC-Induktion bei einer einheitlichen Konzentration aller Metalle zu verfolgen. Vielmehr wurde eine Metallkonzentration gewählt, die gerade eine Wachstums- hemmung erkennen ließ, also toxisch, aber nicht letal war. So wurden R. serpentina Zellsuspensionskulturen mit 1000 μM ZnSO_4 , 50 μM CuSO_4 , 800 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ und 10 μM $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ für 4 Tage belastet und aus dem Gewebe ein Schwermetall-haltiges Material nach der Methode der Phytochelatinreinigung isoliert. Durch Metallanalysen der einzelnen Reinigungsstufen ließ sich, bezogen auf den SM-Gehalt des Zellrohextraktes, eine SM-Ausbeute für Zink von 18%, Kupfer 35% und Blei 38% belegen (Tab. 19). Die mittlere Ausbeute mit etwa 30% liegt unter der von Cd-PC (vgl. Tab. 17). Größere Verluste, ca. 20-25% des Metalls, traten im Vergleich zu Cd-PC (ca. 10-12%) während der Ionentauschchromatographie und Ultrafiltration auf. Die besonders geringe Ausbeute der Zn-haltigen Substanz könnte in der im Vergleich zu Cd schwachen Bindung von Zink an Thiolgruppen beruhen. Zinkionen werden bereits durch leichtes Ansäuern und möglicherweise im beträchtlichen Maße durch Mercaptoethanol, das im Aufschlußpuffer vorhanden ist, aus dem PC-Thiolatkomplex freigesetzt. Daß das Zn-Isolat Cystein

enthielt, zeigte die Aminosäureanalyse, die kennzeichnend für PC war (Abb. 35A). Auch alle anderen Schwermetall-haltigen Präparationen wiesen nur die Aminosäuren Glutamin/Glutaminsäure, Cystein und Glycin auf, in Cd-

	Zink	Kupfer	Blei
	1000 μM	50 μM	800 μM
Gewebe (TG)	25,1 g	18,2 g	16,8 g
Metallgehalt			
(mg / %)			
Rohextrakt	53,4/100	3,57/100	11,3/100
DEAE-Eluat	32,4/ 61	2,40/ 67	8,9/ 81
Salzfällung	24,6/ 46	2,24/ 63	6,8/ 62
Ultrafilt.	10,5/ 21	1,33/ 37	5,0/ 44
Gelfiltrat.	9,5/ 18	1,25/ 35	4,3/ 38

Tab. 19: Schwermetallbilanz der Phytochelatinisolation aus R. serpentina. Aus 300–400 g (Frischgewicht) Zellsuspensionsgewebe, das 4 Tage mit Schwermetall belastet worden war, erfolgte die PC-Isolierung.

	Zink	Kupfer	Blei	Quecksilber	Cadmium ^a
Glutamat ^b	46,2	41,1	48,7	43,9	44,7
Cystein ^c	42,3	48,1	38,5	40,8	44,9
Glycin	11,5	10,8	13,4	15,3	10,4

Tab. 20: Aminosäureanalyse der Phytochelatine isoliert aus Rauvolfia serpentina nach Schwermetallbelastung.

Angaben in Molprozenten

^a Aus Tab. 6 übernommen

^b Summe von Glutamin und Glutaminsäure

^c Quantifiziert als Cysteinsäure

PC-ähnlichen, molaren Verhältnissen (Tab. 19). Ein vergeblicher Versuch, den Ninhydrin-positiven Zn-Komplex im Edmanabbau zu sequenzieren, belegte zuletzt, zusammen mit der Hydrazinolyse, die ein C-terminales Glycin nachwies (Abb. 35B), die Identität des Isolats mit PC.



Abb. 35: Chromatogramm der Aminosäureanalyse (A) und Hydrazinolyse (B) von Zn-PC. Leucin war als innerer Standard dem Isolat zugesetzt worden. Daraus läßt sich ersehen, daß im Trennlauf der Hydrazinolyse etwa 30% der Molmenge des in (A) gezeigten Chromatogramms eingesetzt wurde. C* bezeichnet Cysteinsäure.

Im Vergleich zu Cd-PC zeigten insbesondere Pb-PC und Hg-PC einen höheren Glycingehalt, erklärbar durch eine Verschiebung der Peptide zu kürzeren PC-Ketten. Tatsächlich zeigten auch HPLC-Trennungen der induzierten Peptide in erster Linie PC₂ und PC₃ (siehe auch Tab. 22). Vielleicht liegt darin die Ursache für die beträchtlichen Metallverluste während der Ultrafiltration

begründet. Bereits bei der Cd-PC Isolierung gingen durch diesen Reinigungsschritt 10-12% Cd verloren. Möglicherweise bilden PC_2 -Monomere kleinere Metallkomplexe, die die Membranen mit einer Ausschlußgrenze, laut Hersteller, von ca. 1kDa noch leichter passieren können. Die Verwendung einer feinporigeren Membran bzw. quantitative Erfassung der PC-Monomeren mittels HPLC, wie sie später ausgearbeitet worden war, sollte diesen Punkt klären. Zweifelsfrei steht jedoch fest, daß Phytochelatin auch durch Zink, Kupfer, Blei und Quecksilber induziert wird, da aus nichtbelasteten Zellen kein PC isoliert werden konnte. Wie die Metallgehalte zeigen, bindet Phytochelatin, auf molarer Basis, etwa gleich viel Cd^{2+} und Pb^{2+} , für Zn^{2+} wurde nur etwa halb soviel gemessen, vermutlich, wie zuvor erläutert, auf Metallverluste während der PC-Isolation zurückzuführen (Tab. 21).

	Zink	Kupfer	Blei	Cadmium ^a
Gewichts- prozent	4,65	16,5	21,7	14,4
Molbasis ^b	0,75	3,11	1,33	1,50

Tab. 21: Metallanalyse von Zn-PC, Cu-PC und Pb-PC aus R. serpentina im Vergleich zu Cd-PC.

^a aus Tab. 4 übernommen, PC-Isolat I

^b μ Mol Metall/ mg metallfreies Phytochelatin

Im Vergleich zu Cd-PC enthielt der Cu-Komplex etwa zweimal so viele Metallionen. Das Phänomen einer effizienteren Kupferchelierung könnte in einem Cu(I)-Komplex, wie für Metallothioneine beschrieben, begründet sein. MT vermögen etwa 10-12 einwertige Schwermetallionen wie Cu^+ , Ag^+ und Au^+ zu binden, und damit ungefähr 1,6 mal mehr monovalente als divalente Kationen. Ob ein Cu(I)-

oder Cu-(II)-Komplex von PC vorliegt, kann durch Elektronenspinresonanzspektroskopie untersucht werden. Mit Kupfer und Zink sind zwei Schwermetalle, die als Spurenelemente im Organismus benötigt werden, in der Lage die Synthese von PC auszulösen. Damit führt eine Erhöhung der zellulären Konzentration an diesen Ionen zu der Bildung von Zn- und Cu-bindenden Peptiden und dadurch wiederum zu einer Verringerung der Konzentration an 'freien' Ionen. Phytochelatine als eine Art Regulativ im Schwermetallhaushalt der Pflanzenzelle?

Eine sicherlich zu früh gestellte Frage, die im Abschnitt D zu diskutieren ist. Aber um weitere Indizien für eine solche Aufgabe der Phytochelatine zu finden, wurde eine umfassende Prüfung der PC-Induktion durch Metalle mit Hilfe des PC-Schnelltestes vorgenommen. Für diese Versuche wurden 3 Tage in Zn- und Cu-freiem Medium kultivierte Zellen von R. serpentina und R. canina mit den unterschiedlichsten Metallösungen versetzt und nach 3 Tagen der Metallbelastung der PC-Gehalt analysiert. Die Resultate sind in Tab. 22 und 23 zusammengefaßt.

Nicht nur die Metallionen von Cd (Abb. 36 A), Zn, Cu, Pb (Abb. 36B) und Hg induzieren die Phytochelatinsynthese, sondern auch Kationen von Ni (Abb. 36C), Au, Ag (Abb. 36D), Sn, Bi, Sb und bemerkenswerterweise auch Anionen wie Arsenat und Selenit. Damit ist eine viel größere Anzahl von Schwermetallen in der Lage das pflanzliche Schwermetall-chelierende System zu aktivieren als für Metallothioneine beschrieben ist (Kägi und Nordberg 1979). Jedoch ist eine weitgehende Übereinstimmung in den induzierenden SM erkennbar. Cd, Zn, Cu, Hg, Pb und Ag sind für PC und MT gleichermaßen wirksame Induktoren, während die Alkali- und Erdalkalielemente, die keine Affinität zu Sulfhydrylgruppen besitzen, nicht induzieren. Mit SH-Gruppen interagieren auch Arsenat, Arsenit (Tab. 23) und Selenit, so daß der Schluß naheliegt, allein die Eigenschaft einer Substanz, in der Zelle SH-

Gruppen zu besetzen, genüge, um die PC-Biosynthese anzuschalten. In der Tat konnte mit 1 mM Ellman-Reagens (Dithio-bisnitrobenzoesäure) PC₂ und PC₃ induziert werden (Abb. 36E).

Metall-salz	Konzentration $\mu\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}$	Phytochelatin $\mu\text{Mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (TG)			Gesamtmenge an (Glu-Cys) in PC $\mu\text{Mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (TG)
		PC ₂	PC ₃	PC ₄	
Cd(NO ₃) ₂ ^a	100	1.27	2.91	2.30	20.5
Pb(NO ₃) ₂	1000	1.78	2.28	0.25	11.4
ZnSO ₄	1000	1.51	1.68	0.12	8.5
SbCl ₃	200	0.94	1.72	0.37	8.5
AgNO ₃	50	1.07	1.90	0.08	8.2
Ni(NO ₃) ₂	100	1.53	0.82	0.07	5.8
Hg(NO ₃) ₂	10	1.28	0.55	0.02	4.3
Na ₂ HAsO ₄	20	1.40	0.34	0	3.8
CuSO ₄	50	0.88	0.41	0.04	3.1
SnSO ₄	100	0.86	0.33	0.03	2.8
Na ₂ SeO ₃	100	0.75	0.22	0.07	2.4
AuCl	50	0.71	0.17	0.03	2.0
Bi(NO ₃) ₃	100	0.69	0.18	0	1.9
TeCl ₄	10	0.58	0.13	0.05	1.8
WCl ₆	100	0.42	0.09	0	1.1
Kontrolle ^b	0	0	0	0	0

Tab. 22: Phytochelatininduktion durch verschiedene Schwermetallsalze in R. serpentina Zellsuspensionszellen

^a In allen Versuchen wurde ein zink- und kupferfreies Nährmedium verwendet.

^b Kein PC konnte nachgewiesen werden nach Belastung der Zellen mit 2 mM Ca(NO₃)₂, Al(NO₃)₃, FeSO₄, MgSO₄, MnCl₂ oder NaCl, mit 0.1 mM NaMoO₄, CsCl oder Cr(NO₃)₃ und mit 0.05 mM UO(NO₃)₂ und 0,02 mM VOSO₄.

Metall- salz	Konzentration $\mu\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}$	Phytochelatin $\mu\text{Mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (TG)			Gesamtmenge an (Glu-Cys) in PC $\mu\text{Mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (TG)
		PC ₂	PC ₃	PC ₄	
Cd(NO ₃) ₂ ^a	100	3,08	2,12	1,28	17,6
Pb(NO ₃) ₂	1000	2,79	2,01	0,51	12,7
NaAsO ₂	50	2,12	1,16	0,28	8,6
Na ₂ HAsO ₄	50	2,01	1,29	0	7,9
Ga(NO ₃) ₃	400	1,80	0,92	0,30	7,6
SbCl ₃	500	1,70	0,90	0,15	6,7
AgNO ₃	50	1,96	0,85	0,03	6,6
Bi(NO ₃) ₃	200	1,33	0,52	0	4,2
Hg(NO ₃) ₂	5	0,98	0,52	0,04	3,7
ZnSO ₄	1000	0,82	0,25	0,02	2,5
PdCl ₂	100	0,45	0,15	0	1,3
Ni(NO ₃) ₂	400	0,37	0,05	0	0,9
Kontrolle ^b	0	0	0	0	0

Tab. 23: Phytochelatininduktion durch verschiedene Schwermetallsalze in R. canina Zellsuspensionskulturen

^a In allen Versuchen wurde ein zink- und kupferfreies Nährmedium verwendet.

^b Kein PC konnte nachgewiesen werden nach Belastung der Zellen mit 2 mM Ca(NO₃)₂, Al(NO₃)₃, MgSO₄, MnCl₂ oder NaCl, mit 0,1 mM NaMoO₄, La(NO₃)₃, CsCl oder Cr(NO₃)₃ und nach Belastung mit 0,05 mM UO(NO₃)₂ und VOSO₄.

Wenngleich nicht in jedem Einzelfall untersucht, werden offensichtlich die induzierenden Substanzen an PC komplexiert wie für Cd, Cu, Zn, Pb und Hg gezeigt werden konnte. Ein kompetitives Abfangen der Schwermetallionen durch die Thiofunktionen von PC, die aufgrund ihrer räumlichen Nähe eine günstige Ligandierung der Ionen und damit Stabilisierung ermöglichen, könnte andere, für die Zelle lebenswichtige SH-Gruppen z.B. an Enzymen schützen. Ein solche Schutzfunktion erfordert eine schnelle

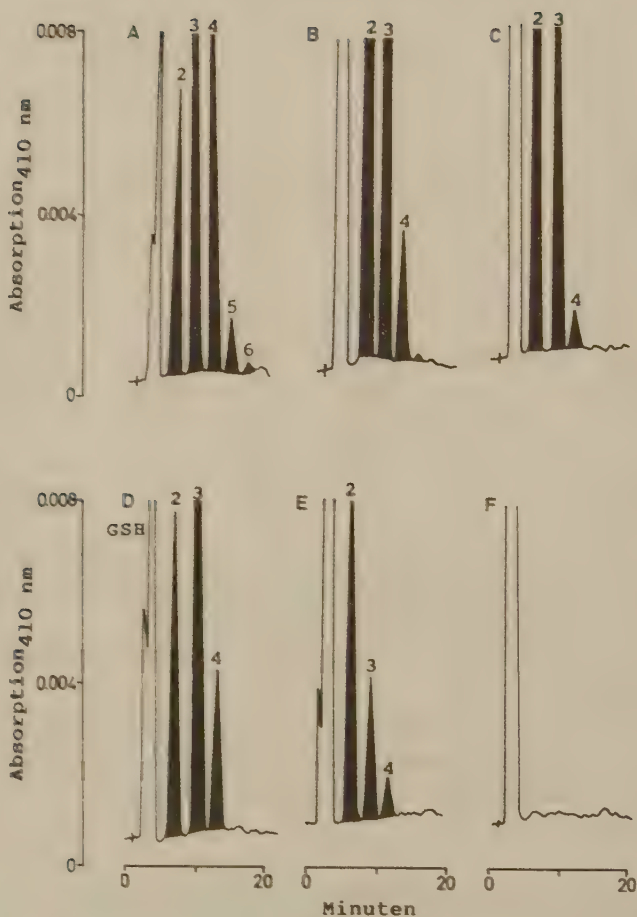


Abb. 36: HPL-Chromatogramme von Extrakten aus *Rauvolfia serpentina* nach Belastung mit 100 μM Cadmium (A), 800 μM Blei (B), 100 μM Nickel (C), 50 μM Silber (D) und 1000 μM Ellman-Reagens (E). In (F) ist der Extrakt von unbelasteten Zellen gezeigt. Alle Versuche wurden in Zn- und Cu-freier Nährlösung durchgeführt. PC-Monomere sind schwarz dargestellt und mit der Indexzahl n für PC_n gekennzeichnet. Die Analytik ist in B. 7 beschrieben.

Biosynthese der chelierenden Moleküle, um die Intoxikation so gering wie möglich zu halten. Unter anderem aus diesem Grund war der Induktionsverlauf von PC nach SM-Exposition von Pflanzenzellen untersucht worden.

Bereits in den ersten Experimenten zur SH-Induktion mit Cd exponierten Zellen von R. canina konnte eine Synthese cysteininhaltigen Materials vor allem in den ersten zwei Tagen, begleitet mit einer entsprechenden Abnahme des im Medium befindlichen Schwermetalls, beobachtet werden (vgl. C 1.3.). Mit der sensitiveren Analytik der PC-Identifizierung durch HPLC konnte der Induktionsvorgang zeitlich noch genauer aufgelöst werden. R. canina Zellen, die 3 Tage nach Inokulation mit $200 \mu\text{M Cd(NO}_3)_2$ belastet waren, synthetisierten bereits 15 Minuten nach Schwermetallzugabe meßbar PC (Abb. 37). Eine lag-Phase war nicht zu beobachten. Die PC-Synthese setzte, soweit erkennbar, sofort und mit einer konstanten Rate von etwa $0,6 \mu\text{Mol Glu-Cys/h} \cdot \text{g TG}$ ein.

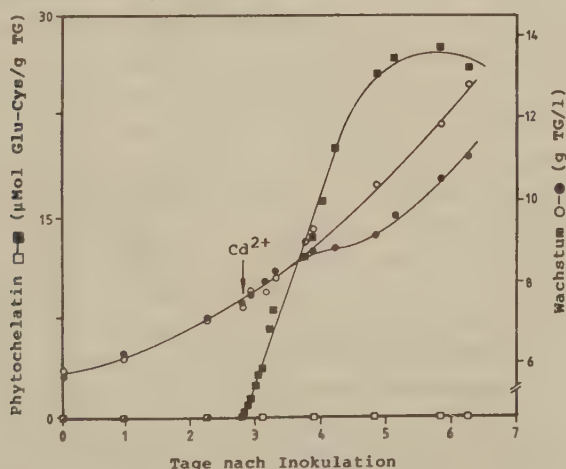


Abb. 37: Synthese von Phytochelatin in Cadmium-exponierten R. canina Zellen (geschlossene Symbole) in Zn- und Cu-freiem Kulturmedium. Die Kontrollwerte wurden mit offenen Symbolen im Diagramm eingetragen.

Die Neusynthese von PC erfolgte auch in diesem Experiment hauptsächlich in den ersten 2 Tagen, vergleichbar der Induktion von SH-Gruppen nach Cd-Belastung von R. canina (vgl. C 1.3.). Danach stagnierte die zelluläre Konzentration an PC und nur noch der PC-Gesamtgehalt der Kultur nahm aufgrund weiterer Zellteilungen zu. Eine im Zeitverlauf identische PC-Induktion konnte mit R. serpentina Suspensionskulturen nach Kupfergabe festgestellt werden (Abb. 38). Interessant ist der zeitliche Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung der belasteten Zellen und der Neusynthese von Kupfer abfangenden Phytochelatinen. Die Wachstumsinhibierung ist wohl auf eine Interaktion von toxischen Kupferionen und essentiellen Molekülen des Primärstoffwechsels (Vallee und Ulmer 1972) zurückzuführen.

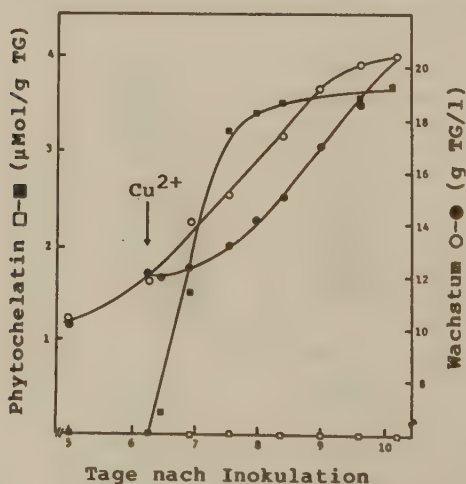


Abb. 38: Wachstumshemmung und Phytochelatininduktion in

R. serpentina nach 50 µM Kupfersulfatzugabe

Schwarz geschlossene Symbole bezeichnen Werte der Cu-belasteten Kultur, offene Zeichen die der Kontrollkultur. Die Zellen wurden wieder in Zn- und Cu-freiem Medium kultiviert.

Diese zelltoxische Wirkung der SM-Ionen konnte offensichtlich beseitigt werden, denn die belasteten Zellen wuchsen nach 2 Tagen vergleichbar der Kontrolle (3g TG/Tag). In der Phase der Wachstumshemmung wurde Phytochelatin synthetisiert. Eine Erklärung für das Zusammenspiel von Wachstumsinhibierung, PC-Synthese und erneutem Zellwachstum könnte eine physiologische Inaktivierung der in die Zellen aufgenommenen Cu-Ionen durch Bindung an Phytochelatin sein.

5.3. Differenzierte Pflanzen

Die vorangegangenen Experimente zeigten die ubiquitäre PC-Induktion in Zellkulturen von Angio- und Gymnospermen durch eine Vielzahl von Schwermetallen. Eine Existenz dieser Peptide mußte auch in differenzierten Pflanzen angenommen werden. Doch gab es zu dieser Schlußfolgerung widersprüchliche Befunde anderer Arbeitsgruppen, die von einem ca. 10 kDa, SM-induzierbaren Metallothionein bzw. MT-ähnlichen Protein in Straußgras bzw. Tomate und Rotkohl berichteten (Rauser und Curvetto 1980, Bartolf et al. 1980, Wagner und Trotter 1982, Wagner 1984). Um die Diskrepanz zu den eigenen Ergebnissen zu klären, wurde die Isolierung des Cd-bindenden Proteins aus Rotkohl, exakt den Angaben von Wagner (1984) folgend, nachgearbeitet. 3 Wochen alte Pflänzchen von Brassica oleracea var. capitata wurden durch Zugabe von $90 \mu\text{M Cd}^{2+}$ in die Hoagland-Nährlösung für 3 Wochen belastet. Nach Aufschluß des Gewebes durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und Mahlen der Probe, wurde Material aus 50 g Rotkohlblättern in leicht alkalischem Puffer aufgenommen. Nach Zentrifugation des so erhaltenen Homogenats wurde ein Teil des zellfreien Rohextraktes auf einer Sephadex G-50 Säule unter den publizierten Bedingungen chromatographiert (Wagner 1984). Die Cd-Gehalte der einzelnen

Fraktionen wurden bestimmt (Abb. 39B) und mit denen eines parallel behandelten Extrakts aus unbelasteten Blättern verglichen, dem Cadmium nachträglich zugesetzt war (Abb. 39A). Der Vergleich beider Chromatogramme belegt eine

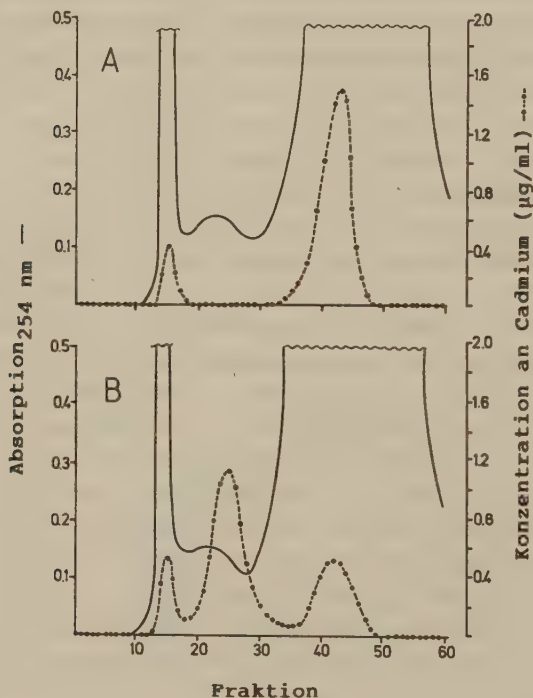


Abb. 39: Gelfiltration des 10 kDa Cd-Proteins aus Brassica oleracea nach Wagner (1984). (A) Rohextrakt aus unbelasteten und (B) aus Cd-exponierten Rotkohlblättern.

Der zellfreie Extrakt wurde aus 3 Wochen mit $90 \mu\text{M Cd}(\text{NO}_3)_2$ belasteten Rotkohlpflanzen gewonnen und auf einer Sephadex G-50 Säule mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 chromatographiert. Den Kontrollpflanzen war Cadmium während des Zellaufschlusses zugesetzt worden.

Induktion eines Cd bindenden Materials, das zwischen den hoch- und niedermolekularen Substanzen als Fraktion 20-30 eluierte: Das 10 kDa Protein von Wagner (1984). Mit dieser Cd-haltigen Substanz waren 59% des nachgewiesenen Cadmiums assoziiert, deren Retentionsverhalten in der Gelfiltration einem globulären Protein von etwa 8 kDa entsprach.

Reinigung der Cd-bindenden Substanz aus etwa 10 g Blattmaterial durch Gelfiltration (155 µg Cd/100%), Ammonsulfatfällung (125 µg Cd/81%) und Entsalzen über Sephadex G-25 (80 µg/52%), Schritte der hier erarbeiteten PC-Isolation, resultierte in 0,54 mg Substanz. Anschliessende HPL-Chromatographie unter Metall-Thiolat-dissoziierenden Bedingungen trennte das '10 kDa' Protein eindeutig in PC₂₋₆ (Abb. 40) auf.

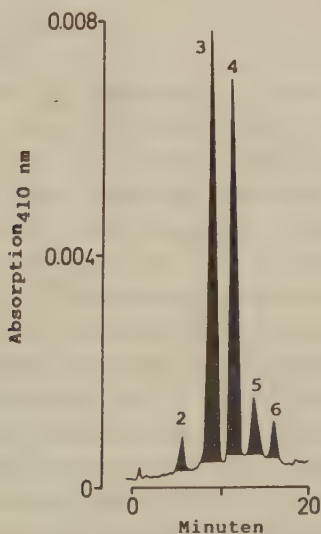


Abb. 40: HPLC-Elutionsprofil des nach Wagner (1984) isolierten, Cd-bindenden Proteins aus Brassica oleracea.

Die Chromatographie wurde unter Metall-Thiolat-dissoziierenden Bedingungen und mit SH-Gruppen spezifischer Detektion durch

Nachsäulenderivatisierung mit Ellman-Reagens durchgeführt. Die PC_n-Peptide sind durch ihre Indexzahl n gekennzeichnet.

Nach einer weiteren PC-Isolierung aus Rotkohlblättern ließ sich das dominante PC-Monomer, PC₃, im 'DNP-Finger-print' zweifelsfrei identifizieren (vgl. C 4.4). Das Molekulargewicht von 10 kDa laut Wagner (1984) bzw. 8 kDa in der hier gezeigten Chromatographie (Abb. 39), das in beiden Fällen in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer bestimmt worden war, ist durch die starke Abhängigkeit des PC-Komplexes von der Ionenstärke zu erklären (C 3.2.). Somit ist das 10 kDa Cd-bindende Protein aus Brassica oleracea in Wirklichkeit Phytochelatin.

Cd-bindende Proteine wurden nicht nur aus Blättern isoliert, sondern auch aus dem Wurzelgewebe von Tomatenpflanzen (Bartolf et al. 1980). Diesem Bericht stand eine später erschienene Arbeit gegenüber, in der Cd-komplexierende, niedermolekulare Proteine von wenigen kDa in Tomatenwurzeln nachgewiesen werden konnten (Benetzen und Adams 1984). Darüber hinaus wurde ein Cd-chelierendes Peptidmaterial in Wurzeln von Mais (Rauser und Glover 1984, Bernhard und Kägi 1986) und Wasserhyazinthen (Fujita 1985) gefunden. Eine Identität der Cd-induzierbaren Peptide bzw. Proteine mit Phytochelatin konnte durch Verifizierung der PC-Induktion in den Wurzeln in all diesen Pflanzen demonstriert werden (Abb. 41). Der PC-Nachweis erfolgte durch Vergleich der Extrakte unbelasteter und Cd-exponierter Wurzeln in der HPLC-Trennung mit SH-Derivatisierung (B 7.). Eine PC-Synthese konnte somit in allen untersuchten differenzierten Pflanzen gezeigt und darüberhinaus '10 kDa' MT-ähnliche Proteine in Pflanzen als PC-Komplexe erkannt werden. Damit können die Aussagen über die Induzierbarkeit von PC, am Modell Zellkultur erarbeitet, auch auf differenzierte Pflanzen übertragen werden. Eine PC-Synthese nach Cd-Belastung konnte in allen überprüften

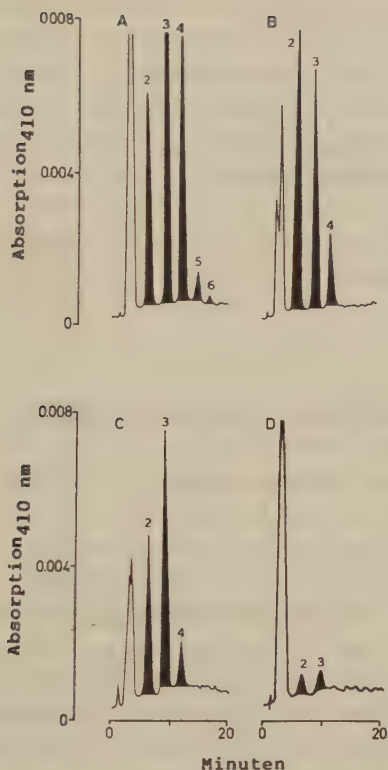


Abb. 41: Phytochelatidinidentifizierung in Wurzeln von Lycopersicon esculentum (A, Tomate), Zea mays (B, Mais) und Eichhornia crassipes (C, Wasserhyazinthe). Die Pflanzen waren mit $20 \mu\text{M}$ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ für 3 Tage belastet worden. Im Chromatogramm des Extraktes unbelasteter Wasserhyazinthen (D) waren geringe PC-Mengen festzustellen, während in allen anderen kein PC nachgewiesen werden konnte. Die Wasserhyazinthen wurden vom Botanischen Garten, München, zur Verfügung gestellt.

differenzierten Pflanzen und Zellkulturen von Angio- und Gymnospermen beobachtet werden, und daher muß ein allgemeines Vorkommen des induzierbaren Phytochelatidin-

systems in Spermatophyta (Samenpflanzen) angenommen werden. Sowohl in Zellkultur als auch in differenzierter Pflanze war das zelluläre Schwermetall Überwiegend an PC gebunden. Da eine Vielzahl von Schwermetallionen die PC-Biosynthese zu induzieren vermag, läßt sich, die Ergebnisse zusammenfassend, sagen:

Phytochelatine sind das Schwermetall-bindende Prinzip der höheren Pflanze!

6. Phytochelatin in Schizosaccharomyces pombe

Phytochelatin als das Schwermetall-bindende Prinzip der höheren Pflanze aufzufassen bedeutet, diese Peptide als eine Entsprechung zu den tierischen Metallothioneinen zu sehen. Metallothioneine konnten nicht nur im Tier vom Seeigel bis zum Säuger und Mensch nachgewiesen werden, sondern auch in den Pilzen Neurospora und Saccharomyces cerevisiae. Aus dem Ascomyceten S. cerevisiae, der Bäckerhefe, wurde 1975 ein Kupfer-haltiges Metallothionein isoliert und eingehend charakterisiert (Prinz und Weser 1975). Molekularbiologische Untersuchungen führten zur Isolierung und Sequenzierung des MT-Genes aus S. cerevisiae (Bust et al. 1984). An der Existenz von MT in dieser Hefe ist nicht zu zweifeln, um so überraschender ist der Befund von Kondo et al. (1985), daß ein anderer Ascomycet, die Spaltheife Schizosaccharomyces pombe, Cd-induzierbare Peptide zu synthetisieren vermag, die mit PC₁ und PC₂ identisch sind. Die Peptide wurden als Cadystin A und B bezeichnet. Bereits frühere Arbeiten dieser Gruppe (Murasugi et al. 1981), wie wir im März 1985 durch eine Publikation erfuhren (Kondo et al. 1985), hatten sich mit dem Cadmiummetabolismus der Spaltheife befaßt und ein induzierbares Peptid bestehend

aus den Aminosäuren Glu, Cys und Gly bestehendes. Diese erste Sequenz wurde 1983 publiziert (Kondo et al. 1983), die später, sowohl bezüglich der Stereoconfiguration der Aminosäuren als auch der Sequenz selbst korrigiert, und durch Cadystin B (PC_2) ergänzt wurde (Kondo et al. 1985). Sollte in dieser Hefe den Pflanzen identische Moleküle zur Schwermetallkomplexierung existieren, während in S. cerevisiae Metalltoloneline diese Rolle übernehmen? Eine nicht zuletzt aus evolutionärer Sicht interessante Frage. Handelt es sich tatsächlich um das gleiche System der Schwermetallbindung in Pflanze und S. pombe, dann müßten Cadystin A und B auch durch andere Schwermetalle induzierbar sein. Außerdem sollten nicht nur diese zwei Peptide gebildet werden, sondern jene PC -charakteristische Familie homologer Moleküle.

6.1. Isolierung und Sequenzierung von Phytochelatin aus Schizosaccharomyces pombe

Um die Cd-induzierbaren Peptide aus Spalthefe mit denen aus Pflanzen vergleichen zu können, wurden S. pombe Zellen gemäß Kondo et al. (1985) kultiviert und mit $1 \mu M$ $Cd(NO_3)_2$ für 24 Stunden belastet. Nach der für PC ausgearbeiteten Methode, jedoch mit modifiziertem Zellaufschluß, wurde das Cd-bindende Material isoliert. Geerntete Hefezellen (100g Naßgewicht) wurden in 50 ml 0,1 M Tris-Cl Puffer, pH 8, suspendiert und mit Glaskügelchen ($\varnothing$ 0,18 mm) in einem Zellhomogenator aufgearbeitet. Alle weiteren Schritte waren identisch mit der PC -Isolation. Im letzten Reinigungs-schritt, der Sephadex G-50 Chromatographie, zeigte sich ein Elutionsprofil, das der PC -Isolation aus pflanzlichen Zellauspensionenkulturen bis auf einen zusätzlichen kleinen Cd- und Cu-naltigen Komplex (ca. 5% der Hauptfraktion) von etwa 1,5 kDa glich (siehe Abb. 42). Die Hauptfraktion mit 51% des im Post-

trakt nachgewiesenen Cd ergab nach Gefriertrocknung 113 mg weißes Produkt (Tab. 24). Der Cd-Gehalt des Isolats lag bei 15,6 Gewichtsprozent.

	Volumen (ml)	Protein ^a (mg)	Cadmium (mg)	Cd-Ausbeute (%)
Rohextrakt	145	469	34,3	100
DEAE-Eluat	62	305	31,2	91
Salzfällung	74	2,3	25,4	74
Ultrafiltr.	5,8	1,7	20,6	60
Gelfiltrat. ^b	52	0,1	17,4	51

Tab. 24: Phytochelatinisolation aus Schizosaccharomyces pombe
Die Zellen waren in der log-Phase bei $OD_{660nm}=1,4$ (Zelldichte $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml) mit $1mM Cd(NO_3)_2$ für 24 Stunden belastet worden.

^a Bestimmt nach der Methode von Bradford (1976)

^b Das Lyophilisat wog 113 mg

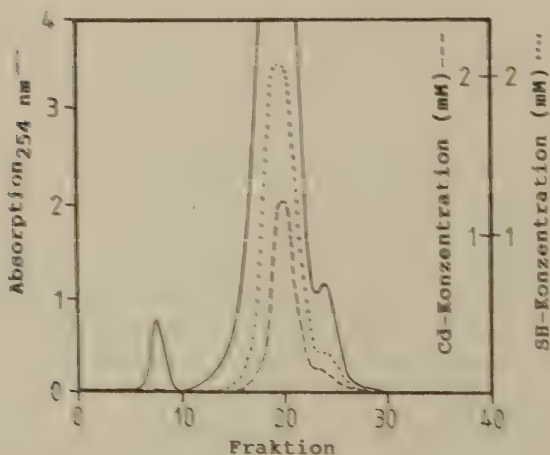


Abb. 42: Chromatogramm der Sephadex G-50 Gelfiltration der Phytochelatinisolation aus Schizosaccharomyces pombe. Neben der

Hauptfraktion befindet sich ein kleinerer Cd- und SH-positiver Komplex von ca. 1,5 kDa (Fraktionen 23-26). Die Bedingungen der Chromatographie sind unter B 4.5. beschrieben.

Das gereinigte Produkt wurde durch HPLC unter Metall-Thiolat-dissoziierenden Bedingungen in mehrere Komponenten getrennt, deren Hauptbestandteile identisch mit PC₂ und PC₃ eluierten, wie der Vergleich mit einer PC-Präparation aus Rosa canina zeigte (Abb. 43). Neben diesen beiden Fraktionen gab es weitere, deren HPLC-Retentionszeiten PC_{4,5,6,7,8} entsprachen. Isolation der einzelnen Komponenten und anschließende Aminosäureanalyse bestätigte eine mit dem jeweiligen PC-Monomer im Einklang stehende Aminosäurezusammensetzung (Tab. 25).

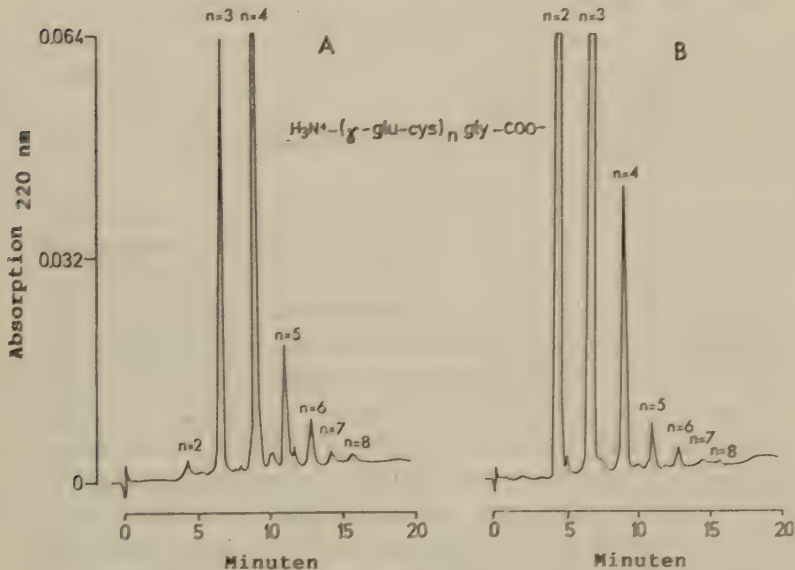


Abb. 43: HPLC Elutionsprofil von gereinigtem Phytochelatin aus Rosa canina (A) und Schizosaccharomyces pombe (B).

Die einzelnen PC_n-Monomere sind durch ihre Indexzahl n bezeichnet. Bedingungen wie in Kapitel B 4.6. beschrieben.

Amino- säure	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
in Molprozenten							
Cys ^a	38,9	44,3	44,0	44,2	45,4	48,3	48,7
Glu ^b	38,6	41,2	44,9	47,1	46,2	44,1	44,3
Gly	22,5	14,5	11,2	8,7	8,4	7,6	7,0
in Relation zur Kettenlänge							
Cys	1,94	3,10	3,95	4,86	5,90	7,24	8,28
Glu	1,93	2,88	4,04	5,18	6,01	6,62	7,53
Gly	1,12	1,02	1,01	0,96	1,09	1,14	1,19

Tab. 25: Aminosäureanalyse der PC₂₋₈ entsprechenden Peptide aus S. pombe, die hier unter PC₂₋₈ aufgeführt wurden.

Die Peptide wurden durch HPLC wie in Abb. 43 gezeigt präpariert.

^a als Cysteinsäure bestimmt

^b Summe von desamidiertem Glutamin und Glutaminsäure.

Nach Inkubation der Peptide mit γ -Glutamyltranspeptidase konnte ein N-terminaler γ -Glutamylrest nachgewiesen werden, in einem folgenden Edmanabbau, modifiziert nach Chang (1983), wurde jeweils ein Cystein abgespalten. Sequenzierung durch Partialhydrolyse von DNP-Peptiden (vgl. B 6.4.) bestätigte die von Kondo et al. (1985) publizierte Sequenz für Cadystin A (PC₃) und B (PC₂). Zugleich konnte PC₄ eindeutig im 'Fingerprint' identifiziert werden (Abb. 44), aber auch die Monomere PC₅₋₈ sind durch ihre N-terminale γ -Glutamylcysteinylgruppe, ihre PC-identischen Retentionszeiten (vgl. C 4.3.) und ihre PC-identischen Aminosäuregehalte im Cd-haltigen Isolat aus S. pombe nachgewiesen worden. Somit besitzt die Spalthefe eine qualitativ identische Reihe homologer Phytochelatine wie die höhere Pflanze.

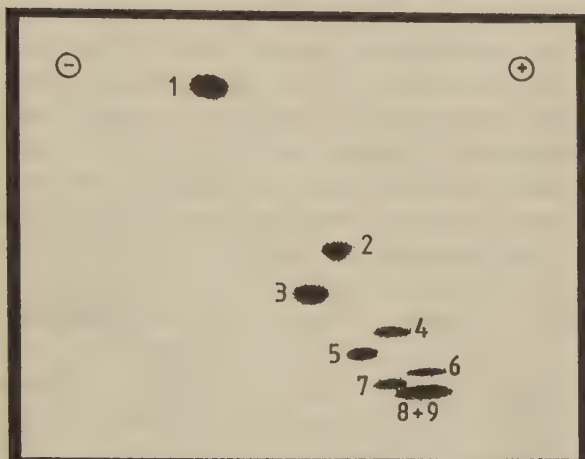


Abb. 44: 'Fingerprint' von partialhydrolysiertem DNP-PC₄ aus S. pombe. Mit den Zahlen 1-9 wurden die DNP-Fragmente entsprechend ihrer Peptidlänge gekennzeichnet. 1: DNP-E; 2: DNP-E-C^{*}; 3: DNP-E-C^{*}-E; 4: DNP-(E-C^{*})₂; 5: DNP-(E-C^{*})₂E; 6: DNP-(E-C^{*})₃; 7: DNP-(E-C^{*})₃E; 8: DNP-(E-C^{*})₄; 9: DNP-(E-C^{*})₄G oder DNP-PC₄. Nähere Erklärung ist in Abb. 28 gegeben.

Naheliegender war nun, nachdem Phytochelatine in S. pombe existieren, zu überprüfen, ob nicht Saccharomyces cerevisiae neben MT auch PC synthetisiert. In mit 1 mM Cd²⁺ belasteter S. pombe wurden klar ersichtlich mehrere PC-Monomere induziert, während in parallel behandelter Saccharomyces cerevisiae kein PC nachgewiesen werden konnte (Abb. 45). Das Chromatogramm des Extraktes unbelasteter Spaltheffen zeigte nur Glutathion und davon nicht getrenntes Cystein (45 A, -Cd). Diese Komponenten waren auch im entsprechenden Elutionsprofil der Bäckerhefe zu erkennen und zusätzlich eine weitere, bei 410 nm absorbierende Fraktion, die aufgrund ihres Retentionsverhaltens kein PC-Monomer darstellen kann (45 B, -Cd).

Eine Induktion dieser unbekannten Substanz in der Hefe unter 1 mM Cd-Belastung konnte nicht festgestellt werden (45 B, +Cd). Die 1 mM Cd-Konzentration war für S. cerevisiae nicht letal. Auch bei anderen Metallkonzentrationen (0,5, 2 und 4 mM Cd^{2+}) konnte in der Bäckerhefe kein PC identifiziert werden. Dieser Befund ist nur durch ein unterschiedliches System der Schwermetall-inaktivierung zu erklären.

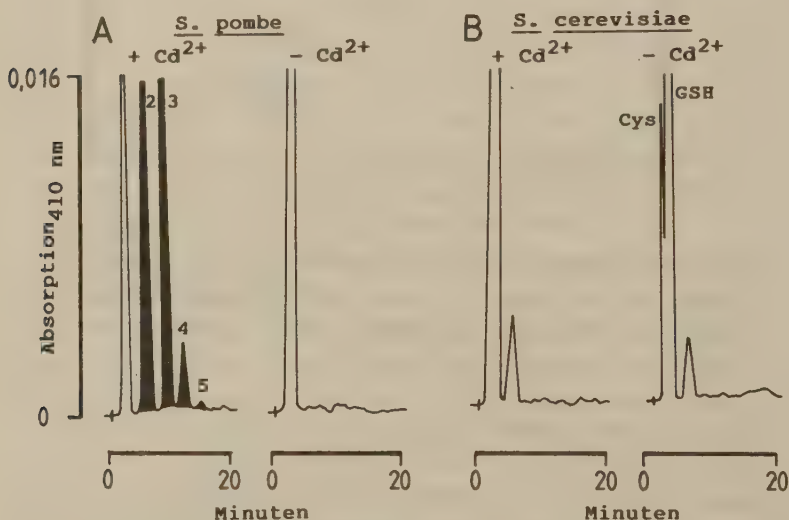


Abb. 45: HPLC-Test auf Phytochelatin im Zellextrakt von Schizosaccharomyces pombe (A) und Saccharomyces cerevisiae (B) Zellen wurden 24 Stunden 1 mM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ exponiert und im PC-Schnelltest untersucht (B 7.). Entproteinisierter Zellextrakt von etwa $0,5 \cdot 10^7$ Zellen wurde durch HPLC getrennt. Schwarz gekennzeichnete Fraktionen stellen die der PC-Monomere dar, versehen mit ihrer Indexzahl n. Cystein (Cys) und etwas später Glutathion (GSH) eluierten unvollständig getrennt zu Beginn des Gradienten. In (B) ist eine weitere Fraktion zu erkennen, die nicht identisch mit PC_2 eluierte (10% früher) und in Kontrolle und Cd-exponierter Hefe nachzuweisen war.

6.2. Induktion durch verschiedene Schwermetalle

Ein weiteres Kriterium für das Vorliegen eines identischen Schwermetall-bindenden Systems in Spalthefe und höherer Pflanze war die Induktion durch gleiche Metalle. Deshalb wurden S. pombe Kulturen mit Metalllösungen versetzt und eine PC-Induktion durch HPLC der Zellextrakte mit SH-spezifischer Detektion nachgewiesen. Da der alkalische Aufschluß des PC-Schnelltestes sich auch für die relativ rigiden Hefen als praktikabel erwies (vgl. Abb. 45), konnte das zeitaufwendige Zerschlagen der Zellen mit Glasperlen vermieden werden. Die Kulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase, bei einer Zelldichte von etwa $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml, durch Zugabe von Schwermetallsalzen für 24 Stunden belastet. Die anschließende Analyse zeigte tatsächlich eine PC-Induktion in Hefezellen, belastet mit Cd^{2+} , Bi^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ und Arsenat (Tab. 26). Cd^{2+} erwies sich eindeutig und viel ausgeprägter als in pflanzlichen Zellkulturen als stärkster Induktor, da Cadmium ungefähr die 5-40 fache PC-Menge im Vergleich zu den anderen Metallionen induzierte. Eine bei Rauvolfia serpentina durch Nickel, Zinn-, Gold- und Selenitionen hervorgerufene PC-Synthese konnte in der Hefe nicht bestätigt werden. In Kulturen mit diesen Metallionen und im unbelasteten Kontrollansatz wurde jeweils kein PC festgestellt. Diese Versuche wurden, die Aussage einschränkend, in einem komplexen, organischen Medium mit Pepton und Hefeextrakt ausgeführt. In einigen Fällen interagierten sicherlich Komponenten des Mediums mit den zugesetzten Metallsalzen und unter Umständen konnte dadurch eine Induktion durch weitere Schwermetalle nicht nachgewiesen werden. Induktionsversuche mit S. pombe in Minimalmedium scheiterten, weil die Zellen kaum wuchsen und unter diesen Bedingungen selbst mit Cd sehr wenig PC produzierten. Dennoch zeigen die Experimente zweifelsfrei die PC-

Neusynthese in S. pombe nach Belastung mit verschiedenen Schwermetallionen, die auch in Pflanzen PC zu induzieren vermögen.

Metall- salz	Konzentration (µM)	Phytochelatin			
		PC2	PC3	PC4	PC5
		(nMol PC/10 ⁹ Zellen)			
Cd(NO ₃) ₂	200	148	303	46	11
Bi(NO ₃) ₃	200	80	24	10	1
Na ₂ HAsO ₄	20	8,4	7,8	0	0
CuSO ₄	200	7,0	5,2	0	0
Pb(NO ₃) ₂	2000	6,3	4,8	0	0
Zn(NO ₃) ₂	2000	5,6	4,3	0	0
AgNO ₃	20	4,8	4,3	0	0
KNO ₃	2000	0	0	0	0
Na ₂ SO ₄	200	0	0	0	0
Kontrolle	0	0	0	0	0

Tab. 26: Induktion von Phytochelatin in Schizosaccharomyces pombe durch Metallionen

Keine Induktion konnte in Zellen belastet mit $200 \mu\text{M}$ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ und SnSO_4 , $20 \mu\text{M}$ AuCl , und Na_2SeO_3 (20 bzw. $200 \mu\text{M}$) festgestellt werden.

Die deutlich kürzere Generationszeit der S. pombe von knapp 2 Stunden (vgl. Abb. 46) gegenüber den pflanzlichen Suspensionskulturen mit einer Teilungsrate von 2-4 Tagen bedingt einen aktiveren Stoffwechsel der Hefe. Aus diesem Grund war ein kürzerer zeitlicher Verlauf der PC-Synthese nach Schwermetallexposition zu erwarten. Die Kinetik der PC-Synthese in den Hefezellen ist in Abb. 46 dargestellt. Ungefähr 24 Stunden nach Metallzugabe kommt die Neusynthese der Peptide nahezu zum Stillstand, während bei R. canina die Synthesephase etwa doppelt so

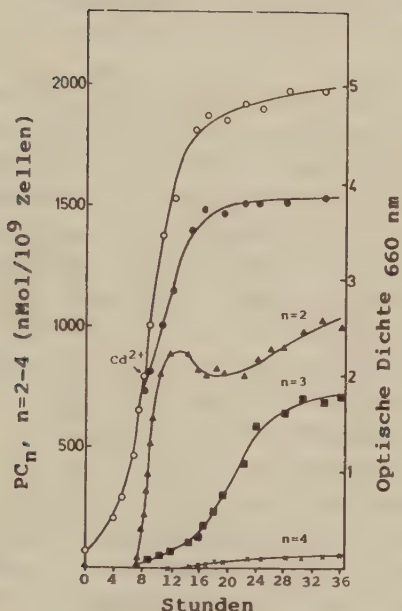


Abb. 46: Zeitverlauf der Phytochelatininduktion in Schizosaccharomyces pombe nach Cadmiumexposition.

Das Wachstum der Kulturen wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 660 nm verfolgt (o-o Kontrolle, ●-● Cd-belastete Hefe). Die einzelnen, nachgewiesenen PC-Monomere wurden wieder mit der Indexzahl n bezeichnet.

lange währte (vgl. Abb. 37). Auffallend ist die starke und fast ausschließliche Synthese von PC_2 in den ersten 4-5 Stunden, die dann stagnierte, gefolgt von einer forcierten Bildung von PC_3 . Diese Beobachtung wäre durch einen Verbrauch von PC_2 durch Addition eines weiteren (γ -Glu-Cys) Restes zum PC_3 zu erklären. Das dazu benötigte Dipeptid könnte von Glutathion stammen oder direkt das Produkt der Glutamylcysteinsynthetase sein. Diese Spekulation zur PC-Biosynthese soll im Kapitel 7. näher untersucht werden.

6.3. Phytochelatinsynthese in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Cadmiumkonzentration

Nachdem ein den höheren Pflanzen gleicher Mechanismus der Schwermetallkomplexierung in S. pombe existiert, stehen die Vorteile eines Mikroorganismus für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Hefen besitzen ein für Eukaryonten kleines Genom von etwa 18 MDa (Winnacker 1984), was für molekularbiologische Untersuchungen von großer Bedeutung ist. Außerdem zeichnen sie sich gegenüber Pflanzenzellen durch eine kurze Generationszeit, Fehlen einer sauren Vakuole und so gut wie keine Phenoloxidasen aus. Letzteres belegte die PC-Isolierung aus Spalthefe, in der ohne Mercaptoethanol als Oxidationsschutz ein 'schneeweißes' PC isoliert werden konnte. In PC-Reinigungen aus pflanzlichen Zellkulturen hatte sich gezeigt, daß Kulturen, zu Beginn der Wachstumsphase mit Schwermetall belastet, überwiegend die kürzeren PC-Monomeren synthetisierten, in der späten log-Phase dagegen hauptsächlich PC₃ und PC₄, während PC₂ nicht nachgewiesen werden konnte (siehe C 4.4.). Dieses Phänomen konnte mit Cd-exponierten Hefezellen verifiziert werden, auch wenn die Häufigkeit der PC-Monomere mehr zu PC₂ verschoben war. So wurde PC₄ im Gegensatz zu Pflanzen niemals als dominantes PC-Peptid gebildet. Zellen, die am Anfang der log-Phase 1 mM Cd²⁺ für 24 Stunden exponiert waren, zeigten in der Analyse fast ausschließlich PC₂ (90%) und nur Spuren an PC₄ (0,5%), höhere Homologe konnten nicht identifiziert werden (Tab. 27). Zellen mit stationärem Wachstum synthetisierten unter gleichen Bedingungen in erster Linie PC₃ (65%), etwa je 1/4 der Molmenge an PC₃ wurde PC₄ und PC₂ gebildet, aber auch andere, längere PC-Homologe bis PC₈. Eine Mittelstellung in der PC-Monomerzusammensetzung nehmen Zellen ein, die während der logarithmischen Wachstumsphase mit Cadmium versetzt wurden. Hier ließ sich vor allem PC₂ und PC₃ in

annähernd gleichen molaren Anteilen (51% und 45%) nachweisen und in geringem Maße PC₄₋₆. Damit konnte klar die an pflanzlichen Zellsuspensionskulturen gemachte Beobachtung eines Einflusses der Wachstumsphase auf die PC-Monomerzusammensetzung bestätigt werden. Die Abhängigkeit der Monomerinduktion von der Wachstumsphase ist wohl dafür verantwortlich, daß im PC-Schnelltest der Pflanzenkulturen PC₂ allgemein mit PC₃ die Hauptfraktion stellte (vgl. Abb. 34 und 36).

Wuchs- phase	OD _{660nm}		Phytochelatin						
	Cd-Zugabe	Ernte	PC ₂	PC ₃	PC ₄	PC ₅	PC ₆	PC ₇	PC ₈
nMol PC/10 ⁹ Zellen									
Frühe log-	0,5	1,8	835	96	5	0	0	0	0
Log-	1,6	2,8	614	542	46	4	2	0	0
Stationäre	4,5	4,6	170	674	175	12	3	1	0,5
Phase									
in Molprozenten									
Frühe log-			89,2	10,3	0,5	0	0	0	0
Log-			50,9	44,9	3,8	0,3	0,2	0	0
Stationäre			16,4	65,1	16,9	1,2	0,3	0,1	0,05
Phase									

Tab. 27: Synthese der Phytochelatinmonomere in Relation zur Wachstumsphase. S. pombe wurde während verschiedener Wachstumsphasen mit 1 mM Cd(NO₃)₂ belastet und 24 Stunden später analysiert.

Zellsuspensionskulturen wurden generell 3 Tage nach Inokulation, also zu Beginn der Wachstumsphase, mit Schwermetall belastet. Möglicherweise besitzt auch der Belastungsgrad Einfluß auf die PC-Monomerinduktion. Um diesen Parameter zu untersuchen, wurde S. pombe mit verschiedenen Konzentrationen an Cd²⁺ belastet und analysiert. Jedoch konnte nur eine geringfügige Veränderung

der PC-Relationen mit steigender Schwermetallmenge festgestellt werden (Abb. 47). Vielmehr konnte eine annähernde Linearität zwischen der Cd^{2+} -Konzentration und den einzelnen PC-Monomeren bis 1 mM Cd^{2+} beobachtet werden. Erst bei noch höheren Schwermetallkonzentrationen verschob sich die Neusynthese zugunsten PC_2 , gleichzeitig nahm der Glutamylcysteinyl-Einbau in PC nur noch unwesentlich zu; ein Zeichen für eine zu starke Belastung

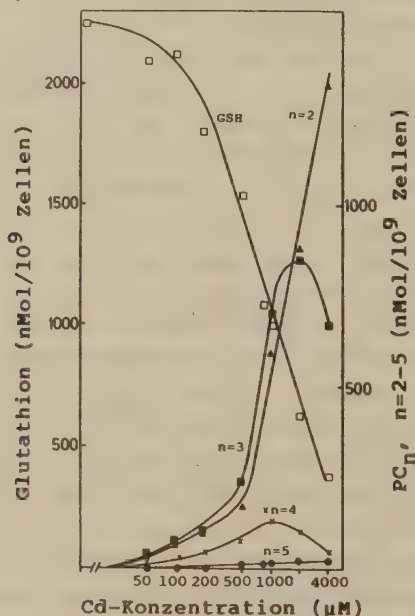


Abb. 47: Phytochelatininduktion in Relation zur Cadmiumkonzentration. Die Indexzahl n steht für das entsprechende PC_n , GSH für Glutathion.

der Zellen bzw. Erschöpfung der zellulären PC-Syntheseleistung. Mit Zunahme der Zellbelastung der Hefe durch steigende Konzentrationen an Schwermetall sank der interne Glutathionspiegel drastisch ab (Abb. 47). Vielleicht ist dies ebenfalls ein Hinweis auf eine Beteiligung von Glutathion an der PC-Biosynthese.

7. Glutathion und Phytochelatin-Biosynthese

Die Primärstrukturen von Phytochelatinen mit ihren repetitiven γ -Glutamylbindungen weisen auf eine nicht ribosomale Peptidsynthese; d.h. es existiert keine mRNA kodierend für PC und kein PC-Gen. Dieser fundamentale Unterschied zu den Metallothioneinen rechtfertigt eine sich gegenüber MT abgrenzende Bezeichnung dieser neuen Substanzklasse. Der homologe Aufbau der Peptide aus polymeren γ -Glutamylcystein-Gruppen mit einem formalen Glutathionrest am Carboxyterminus deutet auf eine Beteiligung dieses Tripeptids an der PC-Biosynthese. Vorstellbar wäre eine sukzessive Kondensation der Dipeptideinheiten, möglicherweise von Glutathion stammend, die vom Glutathion (GSH) über PC_2 zu PC_3 und den anderen Monomeren führt. Eine solche Biosynthese wurde bereits aus dem Induktionsverlauf der PC-Bildung in S. pombe gemutmaßt (C 6.3.). Diese Hypothese sollte durch Untersuchung der Kinetik der Monomersynthese und gleichzeitiger Verfolgung der zellulären GSH-Konzentration näher geprüft werden.

7.1. Kinetische Untersuchung

Im PC-Schnelltest von Rohextrakten wird nicht nur PC erfaßt, sondern auch die SH-haltigen Substanzen Cystein und Glutathion (GSH), die als Doppelpeak mit geringer Retentionszeit eluieren (vgl. Abb. 45 B). Glutamylcystein würde zusammen mit Glutathion eluieren, liegt jedoch in der Zelle in vernachlässigbar geringer Konzentration vor (1-3% von GSH). Somit war eine gleichzeitige Bestimmung des GSH- und PC-Gehaltes von R. serpentina Zellsuspensionskulturen in einfacher Weise möglich. Zu 3 Tage alten Kulturen in zink- und kupferfreiem Nährmedium wurde $200 \mu\text{M Cd(NO}_3)_2$ gegeben und 9 Stunden lang in kurzen Zeitab-

standen gemessen. Wie in Abb. 48 ersichtlich, setzte die PC-Synthese sofort, ohne erkennbare Verzögerung, nach Metallzugabe ein. Gleichzeitig verminderte sich der GSH-Gehalt der Zellen nahezu dem Einbau von Glutamylcystein in PC entsprechend. Dieser GSH-Abfall war nicht durch eine Präzipitation mit Cd bedingt, denn in Kontrollzellen mit nachträglich zugesetztem Schwermetall konnte keine Veränderung der GSH-Konzentration unter diesen Metall-Dissoziierenden Analysebedingungen festgestellt werden.

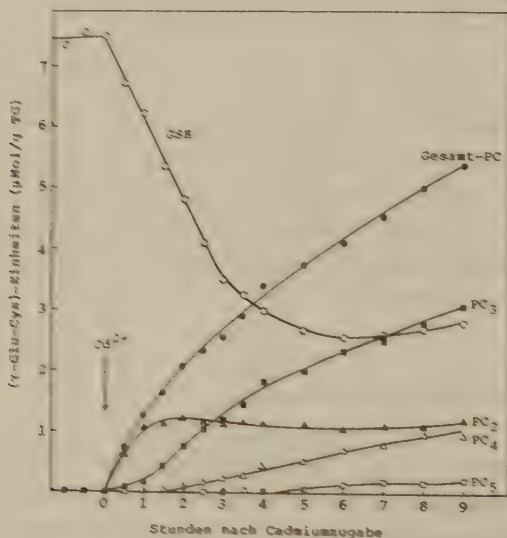


Abb. 48: Phytochelatininduktion und Glutathionverbrauch in R. serpentina nach Zugabe von Cadmiumionen. Suspensionszellen von R. serpentina wurden nach 3 tägiger Kultivierung in einem Fernnachkolben mit 1 Liter Kultur mit $200 \mu\text{M Cd}(\text{NO}_3)_2$ belastet. Die Zelldichte der Kultur betrug $8,6 \text{ g Tg l.}$ In halb- bzw. einstündigen Abständen wurde die Glutathion- (GSH) und PC-Konzentration der Zellen bestimmt (vgl. B 7.).

Während der ersten Stunde der PC-Synthese war fast nur PC₂ (ca. 85%) nachweisbar, das dann eine konstante Konzentration erreichte. Parallel dazu setzte die verstärkte Bildung von PC₃ ein, das nach 3 Stunden der Cd-Exposition den PC₂-Gehalt (an Glu-Cys Einheiten) übertraf. PC₄ und PC₅ wurden erst nach 2 und 4 Stunden detektiert. Die chronologische Abfolge der Nachweisbarkeit der einzelnen PC-Monomere und der Verbrauch von GSH stehen im Einklang mit der Hypothese der PC-Biosynthese. GSH dient hierbei als Substrat und führt nach Abspaltung eines Glycins zu PC₂, das dann durch Anfügen eines weiteren γ -Glutamylcysteinylrestes zu PC₃ umgesetzt wird, aus welchem wiederum PC₄ gebildet werden kann, und so fort. Nachdem PC₂₋₄ Hauptbestandteile des isolierbaren PC-Komplexes sind, die anderen PC-Monomere hingegen in geringeren Mengen synthetisiert werden, müssen PC₄₋₁₀ im Vergleich zu Glutathion, PC₂ und PC₃ schlechtere Substrate für die Kondensation weiterer Dipeptidyl-Einheiten sein. Diese Aussage gilt jedoch nur, wenn ein Enzym für die PC-Bildung verantwortlich ist (siehe D 3.). Ist tatsächlich GSH oder dessen biosynthetische Vorstufe γ -Glutamylcystein an der PC-Bildung beteiligt, muß deren eigene Neusynthese stark aktiviert werden. Als Anhaltspunkt für das Ausmaß der Synthese mag ein früheres Experiment an R. canina dienen, in dem ein ca. 6 facher Anstieg des zellulären SH-Gehalts nach Cd-Belastung beobachtet wurde (vgl. C 1.3.). Daß eine Aktivierung der GSH-Synthese stattfindet, belegt der hier gezeigte Versuch (Abb. 48). 6 Stunden nach Cd-Zugabe erreichte die absinkende GSH-Konzentration der Zellen ihr Minimum bei ca. 40% des anfänglichen Wertes. Im weiteren Verlauf stieg sie wieder etwas an und erreichte nach 20 Stunden ein konstantes Niveau bei 60% des ursprünglichen Gehaltes, obwohl PC ungemindert gebildet wurde. Weiteren Aufschluß über das grundlegende Zusammenspiel von Glutathion- und Phytochelatinbiosynthese sollte die spezifi-

eine Inhibierung des zellulären Glutathionsyntheseweges geben.

3.2. Inhibierung der Phytochelatin-Biosynthese mit Buthioninsulfoximin

Für selektiven Hemmung der GSH Biosynthese stehen zwei Inhibitoren zur Verfügung: Methionin- (Meister und Tate 1976) und Buthioninsulfoximin (Griffith und Meister 1979). Beide unterbinden die Katalyse von Glutaminsäure und Cystein zu γ -Glutamylcystein. Auch das Buthioninderivat setzt sich durch ausschließliche Inhibierung der Glutamylcystein synthetase aus, während Methioninsulfoximin auch die Glutaminsynthetaseaktivität beeinträchtigt.

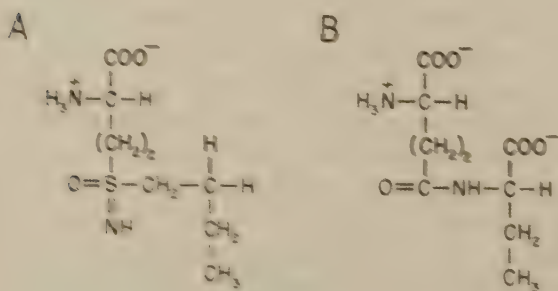


Abb. 49: Strukturformel von Buthioninsulfoximin (A) und dessen Analogon γ -Glutamylaminobuttersäure (B). Buthioninsulfoximin ist ein spezifischer Inhibitor der γ -Glutamylcystein synthetase (Griffith und Meister 1979).

Buthioninsulfoximin (BSO) ist als Analogon von γ -Glutamylaminobutyrat aufzufassen (Abb.49). Letzteres ist ein in

vitro mögliches Produkt der Glutamylcysteinsynthetase. Die Inhibierung erklärt man sich als eine kovalente Bindung von BSO an das Enzym über die Sulfoxygruppe des Inhibitors (Griffith 1981). Hierbei spielt der Reaktionsmechanismus der Glutamylcysteinylsynthetase eine Rolle, den man sich folgendermaßen vorstellt (Meister 1985): Die Synthetase katalysiert gewöhnlich die Phosphorylierung der γ -Carboxygruppe von Glutaminsäure, die dadurch über diese Phosphatgruppe kovalent mit dem Enzym verbunden ist. Erst durch Reaktion der nun aktivierten Glutaminsäure mit Cystein wird die kovalente Bindung aufgehoben und das Dipeptid freigesetzt. Im Falle von gebundenem BSO kann Cystein wegen einer sterischen Abschirmung durch den Butylrest nicht mit der Phosphatylgruppe reagieren, mit der Konsequenz einer nahezu irreversiblen Inaktivierung der Glutamylcysteinsynthetase (Griffith 1981, Meister 1985).

Mit diesem Inhibitor wurden R. serpentina Zellsuspensionskulturen 3 Tage nach Inokulation versetzt. Es wurden drei Versuchsreihen angesetzt mit 0, 0,2 und 2 mM BSO. Jede Reihe wurde nach 6 stündiger Vorinkubation des Hemmstoffs mit verschiedenen Konzentrationen an Silberionen für 3 Tage belastet. Anschließend wurde der PC-Gehalt der einzelnen Kulturen bestimmt und gegen die SM-Konzentration aufgetragen (Abb. 50). Als Resultat zeigte sich eine drastische Minderung der PC-Synthese in Kulturen mit Hemmstoff der GSH-Biosynthese. Unabhängig von der Schwermetallbelastung ($10-100 \mu\text{M Ag}^+$) konnte eine Inhibierung der PC-Bildung von ca. 60% in Kulturen mit 0,2 mM BSO verzeichnet werden, Zellen mit zehnfach höherer BSO-Konzentration zeigten nur etwa 10% des PC-Gehaltes der Kontrolle. Eine Toxizität des Inhibitors konnte bei keiner dieser BSO-Konzentrationen beobachtet werden, da das Zellwachstum in Gegenwart von BSO in unbelasteten Kulturen nicht beeinträchtigt war.

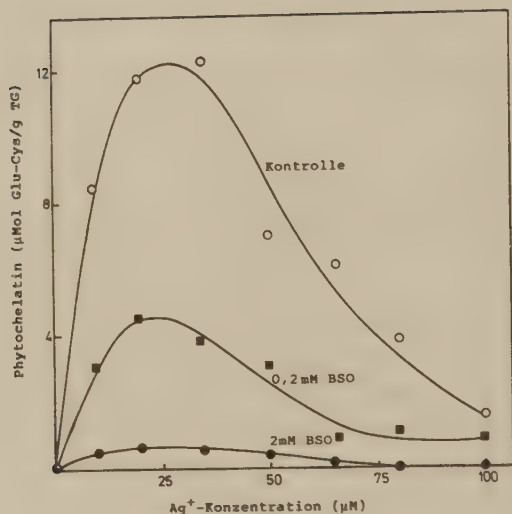


Abb. 50: Inhibierung der Phytochelatinbiosynthese durch Buthioninsulfoximin in Rauvolfia serpentina Zellsuspensionskulturen mit Silberionen belastet. Zellsuspensionskulturen (30 ml) wurden in drei Versuchsreihen mit 0, 0,2 und 2 mM BSO versetzt. Nach 6-stündiger Inkubation des Inhibitors wurden die Zellen verschiedenen AgNO_3 -Konzentrationen exponiert und nach 3-tägiger SM-Belastung der PC-Gehalt der Zellen bestimmt.

Der Zellzuwachs bei allen SM-freien Kulturen betrug in drei Tagen $4,4 \text{ g TG/l} \pm 10\%$ (Tab. 28). Hingegen wurde eine Wachstumshemmung bei $35 \mu\text{M Ag}^+$ exponierten und mit BSO inhibierten Zellen festgestellt: 21% bei Kulturen mit 0,2 mM BSO und 68% bei 2 mM BSO im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor (Tab. 28).

Aus diesem Befund läßt sich folgern, daß Zellen mit eingeschränkter Fähigkeit Phytochelatin zu produzieren, bei niedrigeren Schwermetallkonzentrationen Wachstumsin-

BSO (mM)	Phytochelatingehalt		Zellwachstum	
	(Glu-Cys)-Einh. ($\mu\text{Mol/g TG}$)	relativer Gehalt	absolut (g TG/l)	relativ
ohne AgNO_3				
0	0	0	4,4	100%
0,2	0	0	4,9	111%
2	0	0	4,1	93%
35 $\mu\text{M AgNO}_3$				
0	12,3	100%	4,5	103%
0,2	3,9	32%	3,5	79%
2	0,6	5%	1,4	32%

Tab. 28: Wachstumshemmung von R. serpentina in Gegenwart von Silberionen und Buthioninsulfoximin.

Zum Zeitpunkt der Schwermetallzugabe wiesen die Suspensionskulturen eine Zelldichte von 9,0 g TG/l auf. 3 Tage danach besaßen unbelastete Kulturen, die als Kontrolle dienten, eine Zelldichte von 13,4 g TG/l (Zeitpunkt der Ernte). Die Zellsuspensionen wurden in Zn- und Cu-freiem Medium kultiviert.

hibierung zeigen. Solche Zellen sind somit weitempfindlicher gegenüber Schwermetallen als Zellen ohne GSH-Biosynthese-Hemmstoff. Daß selbst eine 10-fach geringere Konzentration an BSO als eine augenscheinlich nicht toxische von 2 mM Inhibitor zu einer geringeren Schwermetalltoleranz führt, schließt weitgehend eine direkte oder mit den Silberionen synergistische Toxizität des Hemmstoffs aus.

7.3. Homo-Phytochelatin

Manche Pflanzen der Ordnung Fabales besitzen anstelle von Glutathion Homo-Glutathion (h-GSH). Zu diesen Pflanzen zählen Phaseolus aureus und Glycine max, die Sojabohne (Price 1957, Carnegie 1963). h-GSH unterscheidet sich von seinem Analogon durch den Austausch des carboxyterminalen Glycinrestes durch β -Alanin. Sollte GSH in der Tat die Vorstufe der PC-Biosynthese sein (vgl. C 7.1. und 7.2.), dann müßte das C-terminale Glycin der PC-Monomere von GSH stammen. Entsprechend sollten dann h-GSH enthaltende Pflanzen ein PC-Derivat synthetisieren mit β -Alanin am Carboxyterminus. Aufgrund dieser Überlegungen wurden auch Vertreter der Ordnung Fabales auf ihre PC-Induktion überprüft. Diese Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn W. Gekeler, derzeit Doktorand an unserem Lehrstuhl.

Um größere Mengen an SM-bindendem Peptidmaterial zur Verfügung zu haben, wurde eine konventionelle Isolierung durchgeführt. Dazu wurden Wurzeln 2 Wochen alter Sojabohnenkeimlingen nach 4-tägiger Belastung mit $20\mu\text{M}$ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ geerntet und analog der PC-Reinigung aus Rotkohl verfahren (siehe C 5.3.). Aufschluß über die zelluläre Cd-Verteilung gab die Gelfiltration des zellfreien Rohextraktes. Etwa 80% des Cadmiums war mit einer in der Elution PC entsprechenden Fraktion assoziiert (Abb. 51'). Die Cd-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und weiter gereinigt. So konnten aus 60 g Wurzeln (Frischgewicht) 10 mg Isolat mit 45% Cd-Ausbeute erhalten werden. Nach Auftrennung der gereinigten Substanz mittels HPLC zeigte sich ein PC-ähnliches Elutionsprofil, jedoch mit leicht verzögerten Retentionszeiten (Abb. 52'), die bereits einen ersten Hinweis einer Diskrepanz der Peptide zu den gewöhnlichen PC-Monomeren darstellten. Die einzelnen Komponenten wurden isoliert und deren Aminosäurezusammensetzung bestimmt.

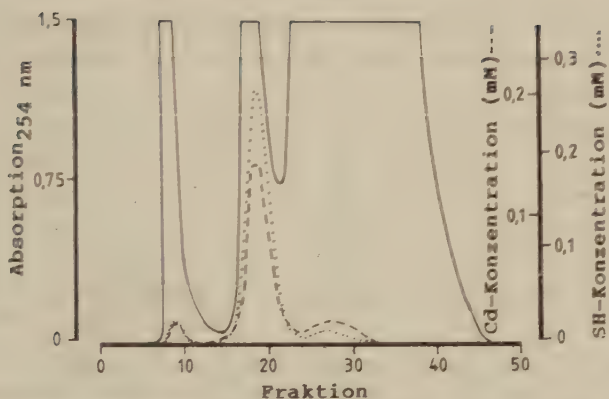


Abb. 51: Gelfiltration von Rohextrakt aus Cd-belasteter Sojabohne. Von Wurzeln 2 Wochen alter Sojabohnenkeimlinge, die für 4 Tage mit $20 \mu\text{M Cd}(\text{NO}_3)_2$ belastet waren, wurde ein Rohextrakt gewonnen und auf einer Sephadex G-50 Säule chromatographiert. Die Bedingungen entsprechen denen in Abb. 10 (vgl. B 4.5).

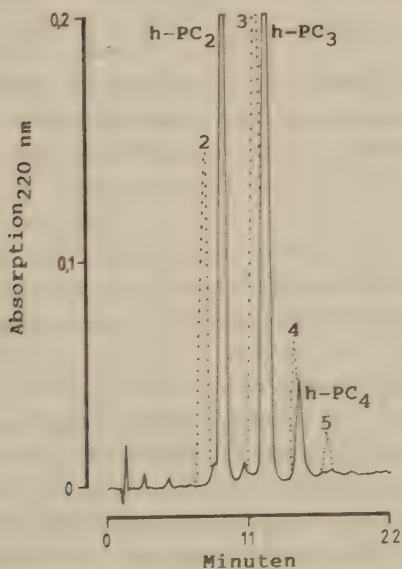


Abb. 52: HPLC-Elutionsprofil von Homo-Phytochelatrin im Vergleich zu entsprechenden Phytochelatinen, die mit der Indexzahl n ge-

kennzeichnet und punktiert im Chromatogramm eingezeichnet wurden. Die Bedingungen für die analytische HPLC sind unter B 4.6. beschrieben.

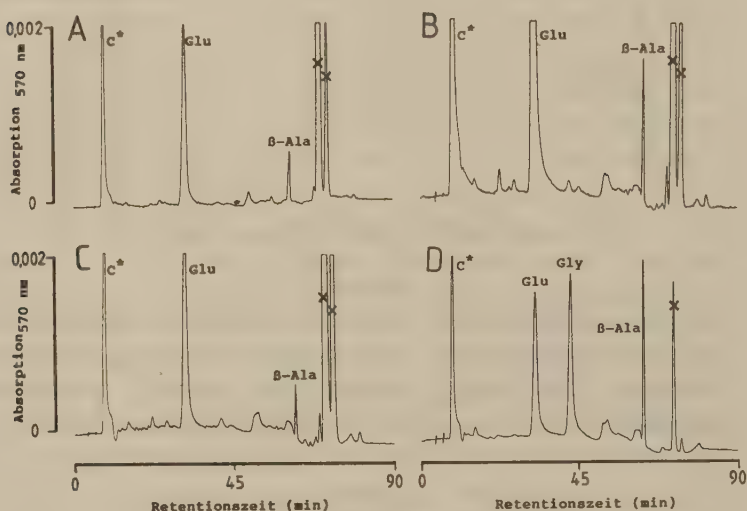


Abb. 53: Chromatogramme der Aminosäureanalyse von h-PC₂ (A), h-PC₃ (B), h-PC₄ (C) und Referenz, 5 nMol GSH und 10 nMol β -Alanin, (D). Ein Chromatogramm von einem Aminosäurestandard ist in Abb. 17 zu sehen.

Neben Glutamat und Cystein konnte eine neue ninhydrinpositive Substanz nachgewiesen werden, die wie β -Alanin von der Kationentauschersäule des Analysators eluierte (Abb. 50A-D).

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme der Analyse ist in Tab. 28 dargestellt. Die ermittelten Werte für β -Alanin streuen stärker als in den vergleichbaren Analysen der PC-Monomere, zum einen, weil der Standard durch Einwiegen von Glutathion und β -Alanin erstellt wurde, zum anderen, weil β -Alanin relativ insensitive gegenüber Ninhydrin ist (etwa 1/4 von Glycin, vergleiche Abb. 50D) und sich kleine Schwankungen in der Flächenbe-

Aminosäure ^a	h-PC ₂	h-PC ₃	h-PC ₄
Glutamat ^b	1,97	3,09	3,96
Cystein ^c	2,09	3,00	3,86
β-Alanin	0,94	0,91	1,18
Glycin	0	0	0

Tab. 28: Aminosäureverhältnisse der homo-Phytochelatine aus

Glycine max

^a 5 nMol GSH und 10 nMol β-Ala dienten als Standard

^b Summe von Glutamin und Glutaminsäure

^c als Cysteinsäure nach Perameisensäureoxidation bestimmt

rechnung der β-Alaninfraktion auf dem Chromatogramm, vor allem bei PC₄, sehr stark bemerkbar machen. Um β-Alanin eindeutig zu identifizieren, wurde die nicht proteino-gene Aminosäure aus dem Hydrolysat durch Elektrophorese auf Dünnschichtplatte (wie für die partialhydrolysierten Peptide ausgearbeitet, vgl. B 5.4.2.) isoliert. Jene Aminosäure besaß unter diesen Bedingungen die größte Mobilität zur Kathode und konnte in der 2. Richtung mit Laufmittel n-Propanol:Wasser, 70:30 vollständig gereinigt werden.

In beiden Trennsystemen konnte kein Unterschied zu authentischem β-Alanin, das als Referenz auch aufgetragen worden war, festgestellt werden, wie der Nachweis von Referenzsubstanz und Aliquoten der Probe durch Besprühen mit Ninhydrinreagens ergab. Von der isolierten Substanz aus Sojabohne wurde ein Massenspektrum durch direkte chemische Ionisation aufgenommen und mit β-Alanin verglichen (Abb. 51). Ein identisches Spektrum resultierte mit den Signalen der Masse: 90 (M + H⁺, 100%); 116 (M + C₂H₃⁺, 46%); 128 (M + C₃H₃⁺, 17%); 146 (M + C₄H₉⁺, 23%) m/z.

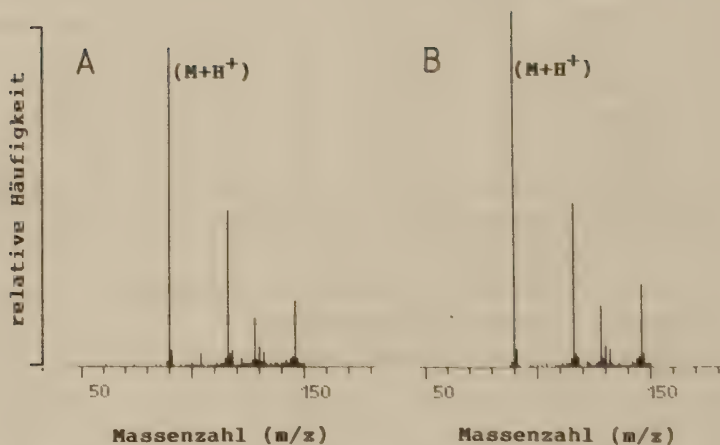


Abb. 54: Massenspektrum der nichtproteinogenen Aminosäure isoliert aus Homo-Phytochelatin (A) und von authentischem β -Alanin (B). Messung erfolgte durch direkte chemische Ionisation mit Butan als Stoßgas.

Die Überprüfung der Primärstruktur erfolgte durch Ansequenzieren der Peptide nach der enzymatisch-chemischen Methode (vgl. B 6.3.). Nach Abspaltung einer N-terminalen Glutaminsäure durch Inkubation der Peptide mit γ -Glutamyltranspeptidase konnte durch modifizierten Edmanabbau ein Cysteinrest entfernt werden. Ferner wurden die isolierten Peptide nach Perameisensäure-Oxidation und Dinitrophenylierung mit Sanger-Reagens am Aminoterminal partialhydrolysiert und die erzeugten Fragmente zweidimensional getrennt (vgl. B 5.4.). Die Chromatogramme von h-PC₂ und h-PC₃ zeigen die für PC typische Zick-Zack Anordnung der DNP-Fragmente (Abb. 55). Trotz des im Vergleich zu Glycin größeren β -Alaninrestes werden intaktes h-PC und das um β -Alanin gekürzte Peptid nicht getrennt.

Abb. 55 A: Dünnschichtchromatographie von partialhydrolysiertem DNP-Homo-PC₂ aus Glycine max. Die Zahlen bezeichnen die DNP-Peptide:

- 1: DNP-E;
 - 2: DNP-E-C^{*};
 - 3: DNP-E-C^{*}-E;
 - 4: DNP-(E-C^{*})₂;
 - 5: DNP-(E-C^{*})₂β-Ala
- E bezeichnet Glutaminsäure, C^{*} Cysteinsäure, β-Ala β-Alanin.

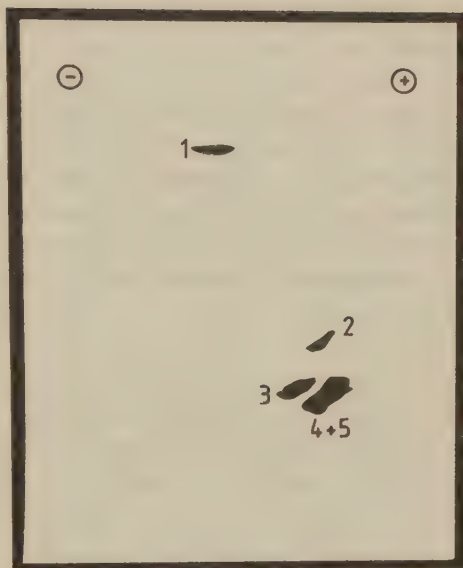
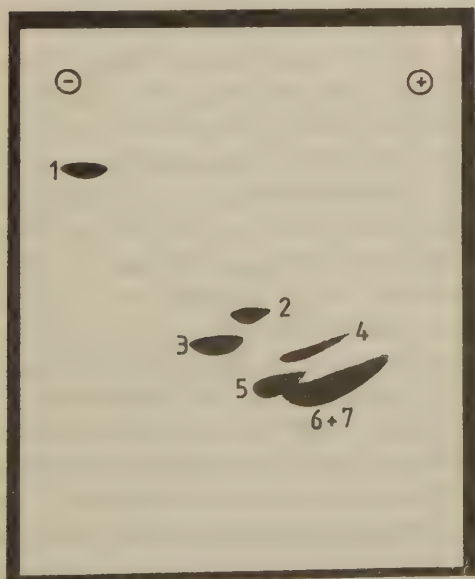
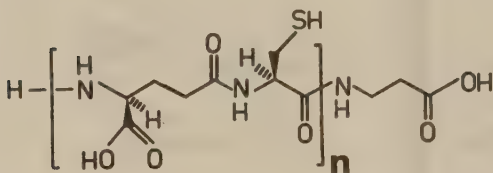


Abb. 55 B: Dünnschichtchromatographie von partialhydrolysiertem DNP-Homo-PC₃ aus Glycine max. Die Zahlen bezeichnen die DNP-Peptide:

- 1: DNP-E;
 - 2: DNP-E-C^{*};
 - 3: DNP-E-C^{*}-E;
 - 4: DNP-(E-C^{*})₂;
 - 5: DNP-(E-C^{*})₂E;
 - 6: DNP-(E-C^{*})₃;
 - 7: DNP-(E-C^{*})₃β-Ala
- Nähere Erklärung ist auch der Abb. 28 zu entnehmen.



Da sowohl die Aminosäurezusammensetzung mit äquimolaren Mengen an Glutamat und Cystein,, der Besitz von γ -Glutamylgruppen und die alternierende Glu-Cys Anordnung in der Primärstruktur der einzelnen Monomere gezeigt werden konnte, sind die Peptide als analoge PC-Moleküle aufzufassen. In Entsprechung zur Bezeichnung Homo-Glutathion (h-GSH) werden diese PC-Monomere Homo-Phytochelatin (h-PC) genannt. Homo-Phytochelatine besitzen die generelle Strukturformel:



oder: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\beta\text{-Ala}$, $n = 2,3,4,5\dots$

Damit sind die Daten ein weiterer Hinweis für die Ubiquität von Phytochelatinen und für die Involvierung von Glutathion in der PC-Biosynthese. Pflanzen wie Glycine max und, hier nicht gezeigt, Phaseolus aureus, die h-GSH besitzen, bilden nach Schwermetallexposition nicht PC, sondern das entsprechende β -Alaninanalogen, Homo-Phytochelatin. Neben den Monomeren h-PC₂₋₄ konnten von Herrn Gekeler in Präparationen aus P. aureus auch h-PC₅₋₇ nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten auch Pflanzen gefunden werden, wie Lathyrus ochrus und Trifolium pratense, die sowohl GSH und als auch h-GSH enthalten. In diesen Fällen wurde nach Cd-Belastung PC und h-PC in ein und derselben Pflanze gebildet. Auch dieser Befund weist auf eine Biosynthese von Phytochelatin und Homo-Phytochelatin mit Glutathion und/oder Homo-Glutathion als Substrat.

8. Intrazelluläre Lokalisation von Phytochelatin

Frühere Befunde zur Schwermetallverteilung in Metall-resistenten Pflanzen wiesen auf eine Speicherung der toxischen Ionen in der Vakuole. Untersuchungen von Ernst (1974) an Zink-toleranten Silene cucubalus Pflanzen zeigten nach differentieller Zentrifugation folgende Zinkverteilung des Blattes: 16% des Schwermetalls wurden in der Fraktion der Zellwände und -kerne nachgewiesen, 4% waren mit Plastiden und Mitochondrien assoziiert und weniger als 0,1 % des Zinks enthielten die Mikrosomen. Der Großteil der Zinkionen mit über 80% entfiel auf den Überstand der Ultrazentrifugation, das heißt auf lösliche Proteine und Vakuolenflüssigkeit. Eine vergleichbare Verteilung wurde auch mit Kupfer, Cadmium und Blei in dieser Pflanze festgestellt (Ernst 1974). Nach Gelfiltration des Ultrazentrifugats konnte das Schwermetall in den niedermolekularen Fraktionen detektiert werden, ein nicht mit einer Assoziation an lösliche Proteine vereinbarer Befund (Ernst 1974). Auch an entsprechend behandelten Wurzelhomogenaten von Agrostis tenuis wurde eine fast vollständige Dialysierbarkeit des Zinks festgestellt (Turner 1970). Diese und ähnliche Ergebnisse (Peterson 1969, Severne 1974) führten zu der Annahme einer Ablagerung des Schwermetalls in der Vakuole (Ernst 1974). Es lag deshalb nahe, eine Speicherung von Schwermetall und Phytochelatin in der Vakuole zu überprüfen. Von R. serpentina Zellsuspensionskulturen, 3 Tage mit $200\mu\text{M Cd(NO}_3)_2$ belastet, wurden Vakuolen isoliert und der Schwermetall- und Phytochelatingehalt von intakter Zelle, Protoplast und Vakuole verglichen. Der Cd-Bilanz der Aufarbeitung ist zu entnehmen (Tab. 29), daß etwa 1% des Schwermetalls der Pflanzenzelle in der Vakuolenfraktion nachgewiesen wurde. Diese Metallspuren können insofern ein Isolations-Artefakt sein, als an den Vakuolen

Fraktion	Volumen (ml)	Partikel (pro ml)	Cadmiumgehalt ($\mu\text{g Cd}/10^6$)	relativ Partikel
Zellen	100	$4 \cdot 10^5$	14,4	100%
Protoplasten	45	$1 \cdot 10^5$	11,7	81%
Vakuolen	5	$2 \cdot 10^5$	0,1	1%

Tab. 29: Cadmiumgehalt der Vakuole im Vergleich zu Protoplast und Zelle. Zellsuspensionskulturen von Rauvolfia serpentina wurden 3 Tage mit $200 \mu\text{M Cd}(\text{NO}_3)_2$ belastet und die Vakuolen wie unter B 2.4 beschrieben isoliert.

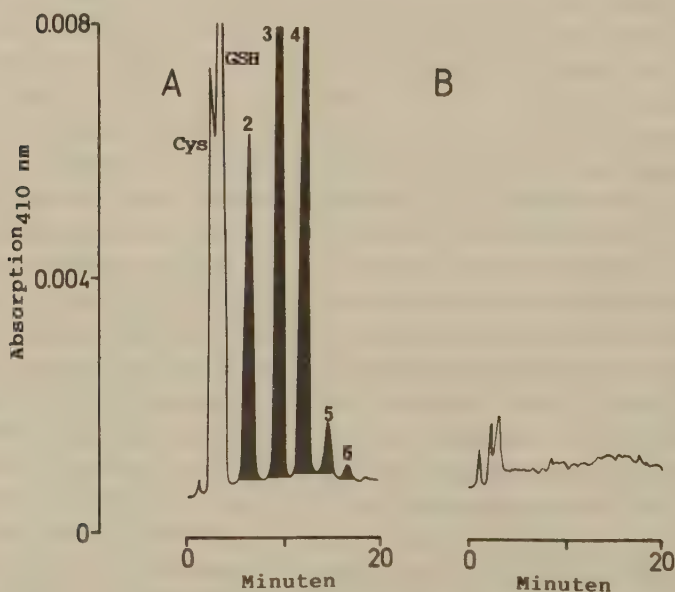


Abb. 56: HPLC-Profile der Protoplasten- (A) und Vakuolenfraktion (B). In beiden Trennläufen wurde der Extrakt aus etwa $2 \cdot 10^5$ Partikeln eingesetzt. Die Detektion von SH-haltigen Substanzen erfolgte durch Nachsäulenderivatisierung mit Ellman-Reagens bei 410 nm. Die Peptide PC_n sind mit ihrem Index n gekennzeichnet.

gelegentlich Reste der cytoplasmatischen Fraktion anhafteten. Knapp 20% des Schwermetalls gingen durch die Protoplastenbildung verloren, vermutlich mit der Zellwand assoziierte Cd-Ionen. Die Hauptfraktion des Schwermetalls muß sich folglich im Zellvolumen des Cytoplasmas und der darin enthaltenen Strukturen befinden. Mit dem Nachweis des Cadmiums in der cytoplasmatischen Fraktion wurde indirekt auch die subzelluläre Verteilung von PC untersucht, da das Cd zu mehr als 90% mit PC assoziiert ist (vgl. C 1.3.). Um ein Vorkommen von metallfreiem PC in der Vakuole auszuschließen, wurde diese Fraktion nach Reduktion mit Natriumborhydrid durch HPLC mit SH-spezifischer Detektion getestet (vgl B 7.). Wie in Abb. 56 gezeigt, ließen sich erwartungsgemäß keine PC-Monomere nachweisen. Daraus läßt sich folgern, daß Phytochelatine wie sie in dieser Arbeit induziert und untersucht wurden nicht in Vakuolen lokalisiert sind.

D. DISKUSSION

1. Metallothioneine in Pflanzen ?

Die Suche nach Schwermetall-bindenden Proteinen in Pflanzen erfuhr durch die eingehende Charakterisierung der tierischen Metallothioneine einen beträchtlichen Anstoß. Biochemische Untersuchungen an Metallothioneinen führten zu einer klaren Vorstellung über Aufbau und Metallbindung solcher Moleküle. Meilensteine in der Erforschung dieser Schwermetall-bindenden Proteine waren nach ihrer ersten Beschreibung (Margoshes und Vallee 1957, Kägi und Vallee 1960), die Ermittlung der ersten MT-Primärstruktur (Kojima et al. 1976) und Gensequenz (Durnam et al. 1980), und die kürzlich erfolgte Aufklärung der MT-Röntgenkristallstruktur (Furey et al. 1986). Die schnell anwachsende Datenfülle belegte die phylogenetisch weite Verbreitung der MT von den vergleichsweise primitiven Pilzen über wirbellose Tiere bis zu den hochentwickelten Säugern (Kägi und Nordberg 1979). Diese Ubiquität, zusammen mit der den Metallothioneinen zugeschriebenen fundamentalen Bedeutung in der Homöostase und Detoxifizierung von Schwermetallen, implizierte die evolutionäre Entwicklung eines ähnlichen oder sogar identischen Systems der Schwermetallchelierung in Pflanzen.

Die Arbeiten von Casterline und Barnett (1977), Weigel und Jäger (1980) und Bartolf et al. (1980) waren wichtige Stationen in der Identifizierung und Isolierung eines anionischen, SM-bindenden Proteins aus höheren Pflanzen von etwa 10 kDa. Aus Straußgras, Agrostis gigantea, reinigten Rauser und Curvetto (1980) ein Cu-bindendes Protein (14 kDa) und folgerten aufgrund des UV-Absorptionsspektrums und der Aminosäurezusammensetzung

(siehe Tab. 30): "Metallothionein occurs in roots of *Agrostis* tolerant to excess copper" (Zitat aus Nature; Rauser und Curvetto 1980). In der gleichen Pflanze konnte nach Cadmiumbelastung ein, diese Metallionen chelierendes Peptidmaterial von 3,7 kDa und hohem Glutamat- bzw. Cysteinanteil, annähernd 40 bzw. 30 Molprozenten (Tab. 30), isoliert werden (Rauser et al. 1983). Messung des Circular dichroismus und der UV-Absorption des Cd-bindenden, niedermolekularen 'Proteins' wiesen auf eine Festlegung der Metallionen in einem Thiolat-Komplex.

Ein ebenfalls als Metallothionein bezeichnetes, Cu-bindendes Protein konnte aus *Silene cucubalus*, Taubenkropf, isoliert werden (Lolkema et al. 1984). Dieses induzierbare Protein mit einem Molekulargewicht von 8,5 kDa zeigte in der Aminosäureanalyse Parallelen zu dem aus *Agrostis* (Rauser und Curvetto 1980) mit einer Dominanz von Glutamat, Cystein, Glycin, aber auch Serin und Aspartat (Tab. 30). Ein Vergleich von Cu-toleranter und -sensitiver Pflanze belegte nach Kupferexposition eine gesteigerte Neusynthese dieses Proteins in der resistenten Pflanze.

Ein weiteres SM-bindendes Protein konnte aus Rotkohl isoliert und durch Aminosäurebestimmung charakterisiert werden (Wagner 1984). Das aus Blättern von Cadmium-exponierter *Brassica oleracea* var. *capitata* gereinigte Protein von 10 kDa enthielt wieder einen hohen Anteil an Glutamat, Cystein und Glycin (Tab. 30). Das Cd-Protein mit einem isoelektrischen Punkt unter pH 4 besaß Untereinheiten von etwa 2 kDa, wie durch denaturierende Gelchromatographie mit 6 M Guanidiniumchlorid evident wurde. Im gereinigten Zustand war das Material tannengrün gefärbt, wie zuvor schon von Bartolf et al. (1980) beschrieben, möglicherweise ein Isolationsartefakt, bedingt durch kovalent gebundene Phenolgruppen (Wagner 1984). Außerdem ließ sich das in Milligrammengen iso-

Pflanze	Agrostis gigantea	Agrostis gigantea	Silene cucubalus	Brassica oleracea	Rauvolfia serpentina	Rauvolfia serpentina	Humane Metallothionein Cd/Zn/Cu ^g
Metall	Cu ^a	Cd ^b	Cu ^c	Cd ^d	Cd ^e	Cu ^f	
Cys	18,4	29,0	9,3	28,9	44,9	48,2	32,8
Asx	10,0	2,5	8,5	4,2	0	0	6,6
Glx	10,0	41,8	19,9	39,0	44,7	41,1	3,3
Gly	11,9	5,5	14,0	11,1	10,4	10,7	8,2
Ser	8,2	9,3	9,8	1,9	0	0	13,1
Thr	2,9	0,8	3,5	1,5	0	0	3,3
Pro	5,8	-	1,9	1,7	0	0	3,3
Ala	6,0	1,5	7,9	2,1	0	0	11,5
Val	4,2	0,7	3,3	0,9	0	0	1,6
Met	0,7	-	3,0	0,7	0	0	1,6
Ile	1,5	0,4	2,9	3,4	0	0	1,6
Leu	3,6	0,6	4,2	1,9	0	0	0
Tyr	0,6	1,3	1,6	0,9	0	0	0
Phe	1,5	0,3	1,3	0	0	0	0
Lys	3,3	1,7	5,1	1,0	0	0	13,1
His	0,8	4,1	3,1	0,8	0	0	0
Arg	1,6	0,4	1,2	0	0	0	0

Tab. 30: Aminosäurezusammensetzung von pflanzlichen, Schwermetall-bindenden Proteinen und Peptiden im Vergleich zu humanem Metallothionein

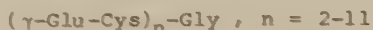
^a Rauser und Curvetto (1980), ^b Rauser et al. (1983), ^c Lolkema et al. (1984), ^d Wagner (1984), ^e und ^f eigene Analysen, ^g Kissling und Kägi (1977, aus der Sequenz abgeleitet)

lierbare Material nicht durch Edmanabbau sequenzieren.

Eigene Ergebnisse, gewonnen an Zellsuspensionskulturen, belegten eine nahezu ausschließliche Bindung des absorbierten Cadmiums an Peptidkomplexe von 3,6 kDa und, zum geringeren Teil, von 2,5 kDa. Dieses Peptidmaterial zeigte sich durch Schwermetall stark induzierbar. Durch die Reinigungsschritte Anionentausch-Chromatographie, Ammonsulfatfällung, Ultrafiltration und Gelfiltration konnte aus Kulturen von Rauvolfia serpentina 180 mg Cd-chelierende Substanz pro Kilogramm Gewebe (Frischgewicht) erhalten werden. In der Aminosäureanalyse ließen sich nur äquimolare Mengen an Glutamat und Cystein und annähernd 11 Molprozent Glycin feststellen (Tab. 30), eine Sequenzierung des Peptidmaterials durch Edmanabbau mißlang. HPLC Analyse des Cd-haltigen Isolats unter metalldissoziierenden Bedingungen führte zu einer Trennung des Komplexes in bis zu 10 verschiedene Peptide. Durch präparative Isolation der einzelnen Peptide und Aminosäureanalyse ließ sich ein Aufbau der Monomeren jeweils aus den zuvorgenannten Aminosäuren mit differierendem Glycingehalt belegen. Bestimmung der C-terminalen Aminosäure durch Hydrazinolyse und Carboxypeptidaseabbau ergab, daß alle Glycinreste den C-Terminus bildeten. Trotz des erfolglosen Edmanabbaus konnte ein freier N-Terminus nachgewiesen werden. Markierung dieser endständigen Aminosäure mit Sanger-Reagens führte zur Identifizierung von Glutamat, das aufgrund seines ungewöhnlichen Verhaltens im Edmanabbau über die γ -Carboxygruppe peptidisch verknüpft vorgelegen haben mußte. Diese Überlegung wurde durch Abspaltung einer Glutaminsäure nach Inkubation der Peptide mit dem spezifischen Enzym γ -Glutamyltranspeptidase verifiziert.

Zwei verschiedene Sequenzierstrategien, einmal mit γ -Glutamyltranspeptidase und manuellem Edmanabbau, zum anderen durch Partialhydrolyse aminoterminal markierter

Peptide eröffneten Wege, die Primärstruktur zu bestimmen. Es ließ sich eindeutig eine homologe Struktur all dieser Cd-bindenden Peptide, bestehend aus polymeren γ -Glutamyl-cysteinyl-Einheiten mit einem C-terminalen Glycin, beweisen. Die Sequenz der Peptide lautet:



Für diese neue Substanzklasse mit bisher unbekannten, repetitiven γ -Glutamylgruppen in Peptiden bis zu 23 Aminosäuren wurde der Begriff 'Phytochelatin' geprägt (Grill et al. 1985a,b). Als Abkürzung wurde PC, für die einzelnen Monomere PC_n gewählt (Index $n=2-11$ kennzeichnet die Anzahl an Glu-Cys-Einheiten). Mit dieser Bezeichnung wurde der Existenz der Peptide im pflanzlichen Organismus und der chelierenden Eigenschaft Rechnung getragen. UV-Absorptions- und CD-Spektren waren im Einklang mit einer Komplexierung von Cadmium über Thiolgruppen. Als Thiolatkomplex werden nicht nur Cd-Ionen gebunden, sondern auch andere Schwermetallionen. Eine Reihe von Schwermetallionen wie Zink, Kupfer, Blei, Quecksilber und Silber sind in der Lage diese Peptide zu induzieren, und im Falle von Zink, Kupfer und Blei wurde das metallhaltige PC isoliert.

Phytochelatine konnten in Zellkulturen von Angiospermen (dikotyle und monokotyle Pflanzen) und Gymnospermen wie Abies grandis und Picea abies nachgewiesen werden. Da diese homologen Phytochelatine einen Großteil des zellulären Cd enthielten und in Zellkulturen verschiedener Pflanzenfamilien identifiziert werden konnten, war eine allgemeine Verbreitung in den höheren Pflanzen anzunehmen. Damit ergab sich eine Diskrepanz zu den Befunden anderer Arbeitsgruppen, die ein Cd-induzierbares Protein nachwiesen, das, soweit ermittelt (Tab. 30), eine gegenüber Phytochelatin divergierende Aminosäurezusammensetzung zeigte (Casterline und Barnett 1977, Weigel

und Jäger 1980, Bartolf et al. 1980, Wagner und Trotter 1982, Rauser et al. 1983, Wagner 1984). Das Cd-bindende Protein aus Rotkohl (Wagner 1984), das ebenfalls nicht durch Edmanabbau sequenziert werden konnte, stimmte in der Aminosäurezusammensetzung weitgehend mit Phytochelatin überein (Tab. 30). Unterschiede bestanden in einem niedrigeren Cysteingehalt und im Vorhandensein geringer Mengen vieler anderer Aminosäuren, vor allem Aspartat. Eine wesentliche Differenz zu PC bestand in dem Molekulargewicht, das nach Gelfiltration mit 10 kDa bestimmt worden war. Um diesen augenscheinlichen Widerspruch zu klären, wurden Rotkohlpflanzen exakt nach den Angaben in der Literatur untersucht (Wagner 1984). Das Cd-haltige Proteinisolat wurde durch HPLC unter Metall-Thiolat-dissoziierenden Bedingungen in mehrere Monomere getrennt, die zweifelsfrei als PC-Peptide identifiziert werden konnten (vgl. C 5.3., Abb. 39 und 40). Das Molekulargewicht von 10 kDa war auf die Abhängigkeit des apparenten $PC-M_r$ von der Ionenstärke während der Gelfiltration zurückzuführen. Mit gereinigtem PC aus R. serpentina konnte bei geringer Ionenstärke (0,01 M) ein apparentes Molekulargewicht von etwa 8 kDa ermittelt werden, ab 0,3 M der minimale Wert von 3,6 kDa. Unter der Ionenstärke, die für die Molekulargewichtsbestimmung des Rotkohlproteins verwendet wurde (0,04 M), zeigte PC aus Zellkultur einen M_r von gut 6 kDa.

Eine noch eklatantere Molekulargewichtsverschiebung konnte von Lue-Kim und Rauser (1986) an den Cd-bindenden Peptiden von Straußgras, Tomate und Mais beobachtet werden. Im hochmolaren Puffer (1 M KCl, 0,05 M Tris-Cl pH 8) wurde ein M_r von 3,0-3,7 kDa gemessen, im Puffer ohne KCl eines von 21,5-26 kDa.

Interessanterweise wurde ein analoges Phänomen bei MT beschrieben und als eine Konformationsänderung des länglich ellipsoiden Moleküls zu einer mehr sphärischen Form in hochmolaren Lösungen interpretiert (Vasak et al.

1984). Inwieweit diese Erklärung auch für PC zutrifft, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Bemerkenswert ist, daß alle Molekulargewichtsbestimmungen, die zu einem ca. 10 kDa, SM-bindenden Protein aus Pflanzen führten, bei niedriger Ionenstärke vorgenommen wurden (Bartolf et al. 1980, Wagner und Trotter 1982, Casterline und Barnett 1982, Wagner 1984, Lolkema et al. 1984, Tukendorf et al. 1984). Dagegen wurde ein Molekulargewicht der pflanzlichen, Schwermetall-chelierenden Substanz von 3-4 kDa ermittelt, wenn Puffer mit hoher Salzkonzentration verwendet wurden (Rauser et al. 1983, Rauser und Glover 1984, Bennetzen und Adams 1984, Jackson et al. 1985, Fujita 1985). Ein artifiziell höheres Molekulargewicht ließe sich auch durch Oxidation der Peptide unter Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken erklären. Eine solche Oxidation könnte nach Verdrängen des Cadmiums aus dem Thiolatkomplex durch SH-haltige Antioxidationsmittel, die allgemein im Aufschlußpuffer enthalten sind, wie Mercaptoethanol und Dithiothreitol bzw. -erythrol, oder durch elektrophoretische Reinigung des Cd-bindenden Materials erfolgen. Durch Elektrophorese wurde das Cd-bindende Protein aus Tomaten- und Rotkohlpflanzen gereinigt (Bartolf et al. 1980, Wagner 1984).

Eine Oxidation der SH-Gruppen Cu-komplexierender Proteine aus Pflanzen ist insbesondere zu erwägen, da natives Cu-haltiges Metallothionein ausschließlich einwertige Kupferionen aufweist. Der Komplex ist sehr sauerstoffempfindlich. Isolation von Cu-MT unter nicht anaeroben Bedingungen resultierte in einem polymerisierten Proteinmaterial und in nicht MT-ähnlichen Artefakten (Kägi und Nordberg 1979). Dieser Punkt verdient insofern Beachtung, als Cu-Phytochelatin möglicherweise aufgrund seines hohen Kupfergehaltes als Cu(I)-Komplex vorliegt (siehe D 3.). Trifft das für die Cu-bindenden Proteine aus Agrostis und Silene tatsächlich zu, wäre einer Ami-

nosäureanalyse mit Skepsis zu begegnen, da während der Proteinisolationen keine entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen getroffen worden waren (Rauser und Curvetto 1980, Lolkema et al. 1984).

Da aus Brassica PC isoliert werden konnte (vgl C 5.3.), ist davon auszugehen, daß die Abweichungen in der Aminosäureanalyse von Wagner (1984) auf kontaminierende Substanzen zurückzuführen sind. Obwohl sich die Analyse im Gegensatz zu der von Rauser et al. (1983) großteils mit der Analyse von PC aus Rauvolfia deckt, beträgt die Verunreinigung immerhin etwa 20% (Tab. 30).

Alle Isolierungen, die zu den publizierten Aminosäureanalysen führten, umfaßten die Reinigungsschritte der DEAE-Ionentauschchromatographie, Gelfiltration und Ultrafiltration. Der einzige substantielle Unterschied der Phytochelatinisolierung war eine zusätzliche Salzfällung mit Ammonsulfat, die aber die eigentliche Reinigung darstellte. In dieser Fraktionierung konnte mehr als 98% des nachweisbaren Protein-/Peptidmaterials entfernt und dadurch ein ca. 99% reines Produkt erzielt werden. Ein Verzicht auf die Ammonsulfatfällung ohne Einführung weiterer Anreicherungsverfahren führt zwangsläufig zu einem nur angereinigten Isolat.

Deshalb ist sehr wahrscheinlich auch das 3,7 kDa, Cd-komplexierende Peptidmaterial aus Agrostis, das eine PC-ähnliche Aminosäurezusammensetzung besitzt, Phytochelatin. Jedoch sind der niedrige Glycin- und hohe Seringehalt schwer zu deuten (Tab. 30). UV-Absorptions- und in Abb. 57 gezeigte CD-Spektren von dieser Substanz und PC aus R. serpentina sind nahezu identisch. In Zellkulturen einer nah verwandten Pflanze, Agrostis tenuis, konnte eindeutig PC nach Cd-Exposition identifiziert werden (vgl. Abschnitt C 5.1., Abb. 37).

Die Verunreinigungen in der Präparation des SM-bindenden Peptids bzw. Proteins machen sich um so stärker bemerkbar, je geringer die zelluläre Konzentration der ge-

erhöhten Gehalts in Ausgangsmaterial ist. Die Cu-Induktion des Kupfer war gegenüber Cadmium um Faktor 7 geringer. Die Ausbeuten der Isolation sogar um über Faktor 10. Merkwürdigerweise sollte die Kontamination durch andere Elemente evtl. gerade in isolierten Cu-bindenden Material zunehmen. Insofern wäre eine größere Divergenz in der Aminosäureanalyse der Cu-induzierbaren

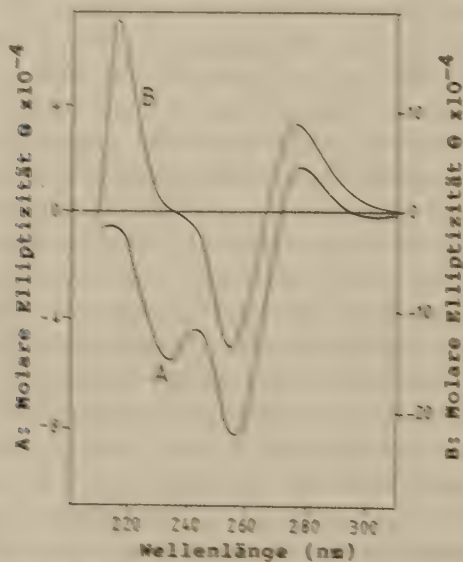


Abb. 57: Vergleich der CD-Spektren von Cu-Phytochelatin aus Rauwolfia serpentina (A) und dem Cu-bindenden Peptidmaterial aus Agrostis gigantea (B), (Rausser et al. 1983). Bedingungen wie in Abb. 12 beschrieben.

Proteine aus Pflanzen nicht überraschend, zumal die Präparationen von Agrostis und Silene nicht vollständig gereinigt werden konnten (Rausser u. Curvette 1980, Iolkema et al. 1984). Die Aminosäuresatzsetzungen weisen dennoch mit hohem dominanten Glutamat-, Cystein- und

Glycinanteil Analogien zu Phytocellatol auf. Die Verwertung eines verunreinigten PC-Isolats wird durch zwei weitere Befunde unterstützt. Zum einen war Cu-PC mit einer Schwermetallausbeute von 34% aus E. serpentina isoliert worden, das heißt mindestens 50% des Kupfers des pflanzlichen Kontraktes war an PC komplexiert, zum anderen konnte PC als Cu-induzierbares, SH-haltiges Material in Zellsuspensionskulturen von Agrostis tenuis und Silene scaberrima identifiziert werden (vgl. C 5.1., Grill 1986). Die Aussage wird allerdings durch eine marginale und nicht eindeutige PC-Induktion durch Kupferionen in Zellsuspensionskulturen von Rosa canina geschwächt. Doch wurde eine Kupfer-abhängige Induktion von cysteinreichen Peptiden bzw. eine Bindung von Kupferionen an diese Moleküle auch von anderen beobachtet (Bennetzen und Adams 1984, Robinson et al. 1986, Lee-Kim und Rauser 1986). Aus diesen Gründen ist die Bezeichnung 'Metallothionein' für die unzureichend gereinigten und charakterisierten, Cu-bindenden Proteine (Rauser und Curvetto 1980, Lolkema et al. 1984) nicht haltbar. Eine abschließende Antwort kann nur durch eingehendere Analyse der Kupferkomplexierung in Pflanzen, die Herr W. Gekeler (am Lehrstuhl von Prof. Zenk) derzeit durchführt, oder durch genauere Untersuchung der isolierten Proteine gegeben werden, wenngleich vieles für PC spricht.

Suspensionskulturen zeichnen sich gegenüber differenzierten Pflanzen klar als das überlegene Arbeitsmaterial aus. Die Vorteile liegen im allgemein höheren Primärstoffwechsel der dedifferenzierten Pflanzensuspension (Zenk 1978) und in der gleichmäßigen Belastung aller Zellen mit Schwermetall ohne zusätzliche Transportphänomene. Als Konsequenz daraus erwies sich, daß die Zellen deutlich höheren Schwermetallkonzentrationen exponiert werden konnten, etwa das 3-10 fache gegenüber differen-

zierten Pflanzen. Außerdem fand eine nahezu vollständige Aufnahme der Ionen innerhalb von 5 Tagen statt, während differenzierte Pflanzen 3-4 Wochen, in allen Fällen unter nicht sterilen Bedingungen, belastet wurden. Abgesehen von einem leichteren Zellaufschluß, der kein Mahlen oder Mörsern des Gewebes erfordert, eine nicht zu unterschätzende Oxidationsgefahr, weisen Zellkulturen den Vorteil geringerer Phenoloxidaseaktivität auf. Diese Aussage wird evident durch die Isolation von sauberem, weißem PC aus Suspensionskulturen, während aus differenzierten Pflanzen grünliche bis bräunliche Produkte erhalten wurden (Bartolf et al. 1980, Wagner 1984, Lue-Kim und Rauser 1986, eigene Beobachtung).

Die durch Untersuchungen an Cd-belasteten Zellsuspensionskulturen erhaltenen Ergebnisse legten eine Ubiquität der Phytochelatine im höheren Pflanzenreich nahe. Daß PC auch tatsächlich in differenzierten Pflanzen eine Rolle spielen, konnte durch Nachweis einer PC-Induktion in verschiedenen Pflanzen bestätigt werden. Neben Rotkohl wurden weitere, von anderen Arbeitsgruppen bereits untersuchte Pflanzen analysiert, nämlich Tomate, Mais und Wasserhyazinthe. In all diesen Pflanzen wurde eine PC-Induktion nachgewiesen (siehe Abb. 41). Einen schlagenden Beweis repräsentieren die vielen (über 100) von Herrn W. Gekeler eingehend überprüften Pflanzen, die zweifelsfrei nach Cadmiumbelastung PC synthetisierten. Ein Cd-bindendes, 10 kDa Protein aus Tomatenpflanzen war bereits 1980 beschrieben worden (Bartolf et. al 1980). In später erschienenen Arbeiten an Tomatenpflanzen konnte ein cysteinreiches, induzierbares Peptidmaterial (Bennetzen und Adams 1984) und ein 3,1 kDa Komplex (Lue-Kim und Rauser 1986) nachgewiesen werden. Dieses 3,1 kDa Material bestand hauptsächlich aus den Aminosäuren Glutamat (53 Mol%), Cystein (26 Mol%) und Glycin (13 Mol%) und enthielt 81% des im Rohextrakt befindlichen Cd. Es

zeigte ein dem Cd-Komplex aus Agrostis identisches CD-Spektrum und wurde als verunreinigte Phytochelatin-Präparation interpretiert (Lue-Kim und Rauser 1986). Diese Schlußfolgerung bestätigt damit eigene Ergebnisse an dieser Pflanze (Abb. 41A).

Aus Maiswurzeln wurden ebenfalls Cd-Peptidkomplexe von 3,0 kDa (Rauser und Glover 1984) und 3-4 kDa bzw. 7-9 kDa (Bernhard und Kägi 1986) isoliert. Diese Komplexe setzten sich aus 1,5-2 kDa großen Untereinheiten zusammen, die ausschließlich aus Glutamat, Cystein und Glycin im Verhältnis von etwa 7:6:1 bestehen sollen (Bernhard und Kägi 1986). Als aminoterminal Aminosäure wurde Glutaminsäure bestimmt, als carboxyterminale Glycin. Diese Daten dokumentieren eine weitgehende Übereinstimmung mit PC. Um letzte Bedenken zu beseitigen, wurde das gleiche Pflanzenmaterial untersucht. In der Tat konnten nur PC₂₋₅ als die Cd-induzierbaren Peptide identifiziert werden (Abb. 41). Eine Erklärung für den geringen Glycin-gehalt von ca. 7 Mol% der aus Mais isolierten Peptide (Bernhard und Kägi 1986) könnte in einer während der Isolation aktiven Carboxypeptidase liegen, wie sie für die intrazelluläre Glycinabspaltung von Glutathion postuliert wird (Steinkamp und Rennenberg 1985). Für die Aminosäureanalyse wurde von Bernhard (1986) S-carboxy-amidoethylierte Peptide eingesetzt, die zuvor durch HPLC getrennt worden waren. Nachdem solche Derivatisierungen nie vollständig sind, kommt es durch inter- bzw. intramolekulare Disulfidbildung sehr leicht zu Artefakten, die sich unter anderem in einem niedrigeren Cysteingehalt in der Aminosäureanalyse (7 Glu: 6 Cys : 1 Gly) manifestieren.

Ein PC₃-identisches Peptid konnte aus Zellkulturen von Datura innoxia isoliert werden. Mit diesem Cd-induzierbaren Peptid war mehr als 81% des von der Zelle aufgenommen Cadmiums assoziiert (Robinson et al. 1986).

Der durch eigene Versuche geführte Nachweis von PC in

Wasserhyazinthe, Eichhornia crassipes, bestätigte die Feststellung von Fujita (1985), daß das Cd-chelierende Material Parallelen zu den SM-bindenden Peptidkomplexen aus Schizosaccharomyces pombe besäße.

Aus dieser Spaltheife hatten Kondo et al. (1985) nach Cadmiumexposition Peptide isoliert und sequenziert, die identisch mit PC₂ und PC₃ waren. Bereits in einer früheren Arbeit dieser Gruppe konnten in diesem Mikroorganismus Cd-bindende Peptidkomplexe von 1,8 kDa und 4 kDa bestimmt werden (Murasugi et al. 1981). Die Sequenzbestimmung der als dimere und tetramere Formen eines heptameren Peptids interpretierten Cd-Komplexe wurde durch eine Kombination von Massenspektroskopie (fast atomic bombardment), Carboxypeptidase P-Abbau und Partialhydrolyse von desulfuriertem Peptidmaterial durchgeführt (Kondo et al. 1983). Die ermittelte Sequenz der heptameren Peptiduntereinheit unterschied sich von PC₃ durch eine Cys-Cys-Gruppe und einen C-Terminus von Cys-Glu-Gly-COOH. Außerdem wurde für einen der drei Cysteinyreste eine D-Konfiguration angenommen. Beide Befunde waren mit eigenen Daten, wenn es sich um identische Cd-bindende Moleküle in Pflanze und S. pombe handelte, nicht vereinbar. Sowohl in der enzymatisch-chemischen Sequenzierung und in der Methode mit dinitrophenylierten, partialhydrolysierten Fragmenten konnte eindeutig und ausschließlich ein Glu-Cys alternierender Aufbau gezeigt werden. Darüber hinaus belegten die isolierten C-terminalen Peptidfragmente die Sequenz Glu-Cys-Gly-COOH. Die Bestimmung der Stereokonfiguration von Cystein mit L-Aminosäureoxidase ergab gegenüber L-Cystein aus Glutathion einen um 3% geringeren Umsatz von insgesamt 75% der eingesetzten Menge (siehe Tab. 8). Wäre tatsächlich jede 3. Aminosäure in der D-Form, hätte der Unterschied in der Desaminierung von Cystein aus PC viel deutlicher ausfallen müssen. Zwar wurden diese Versuche mit dem

Monomerengemisch gemacht, jedoch stellte PC₃ neben PC₄ die Hauptkomponente mit über 40%. Eine grundsätzliche Substitution eines Cysteins im PC-Molekül durch ein D-Isomer ist damit ausgeschlossen. Die an Pflanzen gewonnenen Ergebnisse wurden durch die Revision der Primärstruktur, Stereokonfiguration von Cystein und durch den Nachweis eines homologen, pentameren Peptids in der Spalthefe, identisch mit PC₂, bestätigt (Kondo et al. 1984, Kondo et al. 1985).

Daß ein den Pflanzen entsprechender Weg der Schwermetallkomplexierung in dieser Hefe existiert, konnte durch eigene Untersuchungen der Peptidinduktion in Cd-belasteter S. pombe bewiesen werden. Neben der Identifizierung von PC₂ und PC₃ ließen sich auch höhere PC-Homologe PC₄₋₈ nachweisen, so daß ein qualitativ identisches Muster der Peptidinduktion zwischen jener Spalthefe und den höheren Pflanzen existiert (Grill et al. 1986a). Zugleich konnte eine PC-Induktion in diesem Mikroorganismus durch 6 weitere Schwermetalle belegt werden. Diese Befunde lassen die von Kondo et al. (1985) gewählte Bezeichnung der beiden Peptide, Cadystin A für das heptamere Peptid und Cadystin B für das pentamere, inadäquat erscheinen. Da die zwei Moleküle zugleich Bestandteil der homologen Phytochelatinfamilie sowohl in S. pombe als auch in den höheren Pflanzen mit etwa 300 000 Arten sind, wurde die Bezeichnung PC₂ und PC₃ vorgeschlagen (Grill et al. 1986a).

Die überraschende Tatsache der PC-Existenz in Spalthefe und einer MT-Existenz in Saccharomyces cerevisiae (Butt et al. 1984), in der kein PC nachgewiesen werden konnte (Abb. 45), deutet auf eine unterschiedliche, evolutionäre Entwicklung der Schwermetallkomplexierung in Eukaryonten. Dieser Gedanke wird durch die Identifizierung von Phytochelatin in niederen pflanzlichen Organismen, in Algen unterstützt (Ergebnisse von Herrn W. Gekeler). Für eine Divergenz in der SM-Komplexierung mag auch die

Tatsache sprechen, daß die beiden Hefen beachtliche phylogenetische Unterschiede aufweisen. Sowohl in evolutionär konservierten Proteinen, als auch im Zellteilungszyklus, in der Genregulation und in der Intronprozessierung wurden ausgeprägte Unterschiede evident (Russell und Nurse 1986). Nukleotidsequenzvergleiche dieser Mikroorganismen deuten auf eine Divergenz, die untereinander der phylogenetischen Distanz Hefe-Mensch entsprechen soll (Russell und Nurse 1986).

Unter diesem Aspekt wird eine möglicherweise phylogenetische Trennlinie der Phytochelatin- und Metallothioneinsynthese in den Eukaryonten verständlicher, die vermutlich zwischen diesen zwei Hefearten verläuft und das Tierreich und Pilze wie *Neurospora* und *Agaricus bisporus*, Champignon, (Lerch 1980, Mürger und Lerch 1985) auf der einen Seite, vom Pflanzenreich und wohl einigen Pilzen auf der anderen Seite trennt.

Die hier gezeigte Ubiquität der homologen Phytochelatine, ihre zentrale Rolle in der Schwermetallbindung, in *R. serpentina* mehr als 90%, in Tomate und *Datura innoxia* 81% (Lue-Kim und Rauser 1986, Robinson et al. 1986) und in Mais über 95% (Bernhard und Kägi 1986), und ihre Induzierbarkeit durch verschiedenste Schwermetalle lassen den Schluß zu:

Phytochelatine sind das Schwermetall-komplexierende
Prinzip der Pflanzen.

Damit zeichnet sich eine Antwort auf die eingangs gestellte Frage nach dem Vorkommen von Metallothioneinen in Pflanzen ab.

In Gelfiltrationsexperimenten war keine Induktion eines SM-bindenden Proteins nach Cd-Belastung feststellbar. Die geringen Cd-Mengen (3-6% des Cd im Rohextrakt) assoziiert mit Proteinen waren im Extrakt exponierter Pflanz-

zen, aber auch im Gewebe der Kontrolle nachweisbar, dem das SM während der Aufarbeitung zugesetzt worden war (Abb. 6 und 39, Grill et al. 1985a, 1987). Eine Schwermetallkomplexierung von mehr als 80, 90 und 95% an Phytochelatin läßt auch keinen Spielraum für eine substantielle oder gar dominierende Bindung an andere Moleküle. Zum Vergleich sind in Säugern mehr als 80-90% des Cadmiums im Organ der Cd-Akkumulation, der Niere, mit MT assoziiert (Kimura et al. 1974, Kägi und Nordberg 1979).

Phytochelatine als Metallothioneine zu bezeichnen wäre eine spitzfindige Provokation, die durch die Erkenntnisse einer völlig andersgearteten Biosynthese und der phylogenetischen Dichotomie der jeweiligen Systeme im Tier- bzw. Pflanzenreich ad absurdum geführt wird.

Der Begriff Metallothionein wurde ursprünglich für das Schwermetall-haltige und cysteinreiche Protein, isoliert aus Pferdeniere, geprägt (Kägi und Vallee 1960, 1961). Später wurde der weiten Verbreitung entsprechender Proteine in Säugern Rechnung getragen und für diese die Bezeichnung übernommen. Zur Definition von MT wurden die Charakteristika des SM-bindenden Proteins aus Pferd herangezogen (siehe Einleitung Seite 4, Vallee 1979). Um SM-bindende Moleküle wie z.B. aus Neurospora mit einer den MT homologen Primärstruktur nicht auszuschließen, wurde die Definition auf eine 'weitgehende' Übereinstimmung in den MT-Kriterien ausgedehnt (Kägi und Nordberg 1979).

Auch wenn Phytochelatine einen hohen Metall- und Schwefelanteil (40-48 Mol%) besitzen, stellen sie aufgrund ihrer im Molekül wiederholten γ -Glutamylbindungen eine völlig neue, bislang in der Natur unbekannte Substanzklasse dar. Diese ungewöhnliche Peptidbindung, die auch in den quervernetzenden Peptiden mancher Bakterienzellwände vorkommt (Schleifer und Kandler 1972), wird nicht an Ribosomen gebildet (siehe D 3.). Deshalb gibt es auch

keine dafür kodierende mRNS bzw. kein PC-Gen; ein tiefgreifender Unterschied zum Metallothionein. Vielmehr konnte eine Beteiligung von Glutathion an der PC Biosynthese gezeigt werden (siehe C 7.1 und 7.2., Grill et al. 1987), wie bereits die Primärstrukturen der homologen Peptide implizierten (Grill et al 1985a). Eine weitere Evidenz der Involvierung von Glutathion war die Identifizierung von Homo-Phytochelatinen (C 7.3.). Diese PC-Derivate mit einem carboxyterminalen β -Alanin statt des Glycins konnten nur in Pflanzen der Ordnung Fabales nachgewiesen werden, in denen Glutathion durch das entsprechende β -Alaninderivat Homo-Gluthathion teilweise oder gänzlich, wie in Glycine max und Phaseolus aureus substituiert ist. In Pflanzen mit partieller Substitution, z.B. Lathyrus ochrus und Trifolium pratense, wurden nach Cadmiumexposition die Induktion von Phytochelatin und auch Homo-Phytochelatin beobachtet. In Cd-exponierten Wurzeln von Sojabohne, Glycine max, waren 82% des im Rohextrakt nachweisbaren Cd mit Homo-Phytochelatin komplexiert (Abb. 51), damit muß auch das von Casterline und Barnett (1977, 1982) beschriebene 'Cd-Thionein' dieser Pflanze von 13 kDa als ein Phytochelatinkomplex gesehen werden (Grill et al. 1986b). Somit konnten 'Thioneine', 'Metallothioneine' oder 'Metallothionein-ähnliche Proteine' in Pflanzen (Casterline und Barnett 1977, Bartolf et al. 1980, Jäger und Weigel 1980, Wagner und Trotter 1982, Rauser et al. 1983, Bennetzen und Adams 1984, Wagner 1984) als peptidisches Phytochelatin erkannt werden.

Da Phytochelatine als ubiquitäre Schwermetall-bindende Peptide in Angio- und Gymnospermen, in Algen und Spalt-hefe nachgewiesen wurden, Metallothioneine aber weder in höherer Pflanze noch in Spalt-hefe, repräsentieren Phytochelatin und Metallothionein zwei unterschiedliche Mechanismen der Schwermetallbindung in Pflanze und Tier.

2. Schwermetalltoleranz der Pflanzen

Pflanzen sind nicht in der Lage die Aufnahme toxischer Schwermetalle zu verhindern. Dieser Befund wird vielfach dokumentiert durch Elementaranalysen pflanzlichen Materials, das SM-reichen Standorten entstammte (zusammenfassende Darstellung: Ernst 1974). Aufgrund dieser Tatsache forderte Jowett bereits 1958 die Existenz eines Mechanismus zur Entgiftung von toxischen Metallen in Pflanzen (Jowett 1958).

Die Suche nach einer Erklärung der Resistenz mancher Pflanzen führte zur Beschreibung verschiedener Mechanismen, zum Teil innerhalb einer Pflanzenspezies. Über diese offenkundige Diversität zeigt sich in der Zusammensetzung der Schwermetallflora eine Gemeinsamkeit, denn die Schwermetallflora umfaßt grundsätzlich nicht spezielle Pflanzenarten, sondern Pflanzen, die zusätzlich diese ökologische Nische nutzen können. Solche Ökotypen für zinkreiche Standorte sind unter anderem Silene cucubalus, Thlaspie alpestre und Viola calaminaria, die unter der Bezeichnung Galmeipflanzen zusammengefaßt werden. Auf Serpentinstandorten, gekennzeichnet durch hohe Zink-, Kupfer- und Nickelgehalte, wurden Minuartia verna, Armeria maritima, Silene cucubalus, Festuca cinera u.a. beschrieben (Baumeister 1967, Ernst 1974).

Unterschiedliche Wege in der Verwirklichung der Schwermetalltoleranz ließ allein die stark differierende Metallanreicherung in Pflanzen eines gemeinsamen Standortes erkennen, die sich in den 'Hyperakkumulierern' manifestiert. Zu den bekanntesten Hyperakkumulierern zählen Pflanzen wie Viola calaminaria und Thlaspie alpestre für Zink, und für Nickel, Alyssium argenteum und Hybanthus-Arten. So konnte auf einem natürlichen SM-rei-

chen Boden ein Zinkgehalt der pflanzlichen Trockensubstanz von 0,07% für Festuca ovina, 0,3% bei Minuartia verna und ein Anteil von 1,5% in Thlaspie alpestre gemessen werden (Ernst 1974). Ein ähnliches Bild ergab die Analyse von Pflanzen eines nickelreichen Standortes mit der weitaus höchsten Nickelakkumulation von 1% in Hybanthus floribundus (Severne und Brooks 1972).

Als möglicher Resistenzmechanismus ließ sich sowohl ein weitgehendes Ionen-Ausschlußvermögen der Wurzeln bei Festuca ovina nachweisen (Baumeister und Ernst 1978), als auch eine Festlegung der toxischen Metalle in der Wurzelzellwand von Agrostis tenuis (Turner und Marshall 1972). Eine weitere Form der SM-Toleranz konnte als eine zelluläre Kompartimentierung bei gleichzeitiger physiologischer Inaktivierung der Schwermetalle beobachtet werden, nämlich eine Speicherung von Zink in Vakuolen von Silene cucubalus, komplexiert mit organischen Säuren (Mathys 1977), und von Nickel im Latex der Pflanze Sebertia acuminata (Jaffre et al. 1976).

Eine weitere Form der physiologischen Inaktivierung von Schwermetallen in Pflanzen könnte deren Bindung an Proteine darstellen. Die ersten, in hohem Maße SM-bindenden Proteine aus Pflanzen konnten in Cu-belasteten Mungobohnen (Premakumar et al. 1975) und in Cd-belasteten Sojabohnen (Casterline und Barnett 1977) nachgewiesen werden. Eine Rolle Metall-bindender Proteine in SM-resistenten Pflanzen dokumentiert die Bindung von Kupfer an ein induzierbares Protein in Cu-toleranter Agrostis gigantea (Rausser und Curvetto 1980). In weiteren Untersuchungen an diesem Straußgras konnte durch Vergleich zur SM-sensitiven Pflanze eine Korrelation zwischen der Metalltoleranz und der Fähigkeit, jenes Kupfer-chelierende Protein schnell zu synthetisieren, gezeigt werden (Rausser 1984).

Ein induzierbares Kupfer-bindendes Protein als möglicher

Resistenzmechanismus wurde auch in Silene cucubalus postuliert (Lolkema et al. 1984). Cu-tolerante Pflanzen zeigten unter Metallbelastung eine gegenüber der Normalform verstärkte Synthese der Cu-komplexierenden Substanz.

Eine Schwermetallresistenz bedingt durch ein Metallkomplexierendes, induzierbares Protein wäre nicht ungewöhnlich, da diese Eigenschaft in überzeugender Weise dem Metallothionein zugeschrieben werden konnte. Dies belegen mehrere molekularbiologische Experimente. Auf Cd-Resistenz selektionierte Säugerzelllinien wiesen eine MT-Genamplifikation auf und überproduzierten dieses Protein (Beach und Palmiter 1981, Gick und McCarty 1982). Mit dem vorangegangenen Befund im Einklang, zeigte eine Cd-hypersensitive Mauszelllinie mit einem durch Methylierung inaktivierten MT-Gen keine nachweisbare MT-mRNA (Mayo und Palmiter 1981). Wurde jedoch diese Methylierung durch 5-Azacytidin Behandlung aufgehoben, konnte MT-mRNA und gleichzeitig eine Cd-Toleranz festgestellt werden (Compere und Palmiter 1981). Eine weitere Evidenz erbrachten Säugerzellen transformiert mit einem MT-Gen enthaltenden Virusvektor, der in hoher Kopienzahl in den Zellen vorlag (Karin et al. 1983). Aufgrund einer erhöhten Expression des MT-Gens durch einen Gen-Dosis-Effekt entwickelten diese transformierten Zellen eine Schwermetalltoleranz. In der Hefe Saccharomyces cerevisiae konnte das MT-Struktur-Gen durch ein anderes Marker-Gen ausgetauscht werden (Hamer et al. 1985). Diese Mutante zeigte, solange sie auf Standardmedium wuchs, keine Abnormalität, jedoch reagierten die Zellen extrem sensitiv gegenüber Kupferionen und transkribierten das Marker-Gen unter der Kontrolle des MT-Promoters in hohem Maße. Zuvor war bereits eine Korrelation erhöhter Kupferresistenz der Hefezellen mit einer 10- und mehrfachen Amplifikation des MT-Genes gezeigt worden (Fogel und Welch

1982).

Ob SM-bindende Moleküle in Pflanzen eine den MT vergleichbare Funktion in der SM-Toleranz einnehmen, darüber sollten auf SM-Resistenz selektionierte, pflanzliche Zelllinien Aufschluß geben.

Tatsächlich konnten Bennetzen und Adams (1984) an SM-resistenten Zellkulturen von Lycopersicon esculentum (Tomate) eine Überproduktion einer SM-bindenden Substanz beobachten. Die Kulturen tolerierten bis zu 1,5 mM Cd^{2+} und bewahrten die Resistenz selbst nach 30 Generationen ohne Selektionsdruck. Unter Cd-Belastung zeigten die Cd-resistenten Zellen gegenüber nicht selektionierten Kulturen eine gesteigerte Synthese eines induzierbaren, wenige kDa großen und hochanionischen Peptidmaterials mit hohem Cysteingehalt. Die Peptide konnten auch mit Kupfer- und Zinkionen induziert werden. Diese Charakterisierung der SM-bindenden Substanz steht im Einklang mit Phytochelatinen. Nachdem das Cd-bindende Material auch in nicht resistenten Zellen induziert wurde und eigene Untersuchungen an dieser Pflanze die Induktion von PC durch Cd belegten, muß es sich hier um Phytochelatine handeln (Abb. 41, Lue-Kim und Rauser 1986). Diese Schlußfolgerung wird durch die Ergebnisse an Cd-resistenten Zellkulturen von Datura innoxia unterstützt (Jackson et al. 1984). Die resistenten Pflanzenzellen, die ebenfalls durch schrittweise Adaption an höhere Cd-Konzentrationen erhalten wurden, zeigten eine mit der Toleranz korrelierte erhöhte Menge niedermolekularer, metallbindender Komplexe. Die Resistenz beruhte nicht auf Ausschluß oder Ausschleusung des Schwermetalls, denn Cadmiumaufnahme und -akkumulation der resistenten und sensitiven Zellen waren gleich. Im weiteren Verlauf konnte dieses induzierbare Material mit dem 81% des zellulären Schwermetalls assoziiert war, als ein Komplex bestehend aus mit PC_3 identischen Peptiden charakterisiert werden (Robinson et al. 1986). Die Synthese von

einem PC₂ entsprechenden Peptid konnte ebenfalls in dieser Zellkultur gezeigt werden (Robinson und Jackson 1986).

Gerade diese Arbeiten an metalltoleranten Pflanzenzelllinien lassen keinen Zweifel an einer Beteiligung von Phytochelatin an der, zumindest im Labor erzeugten, Schwermetallresistenz.

Daß Phytochelatin eine detoxifizierende Wirkung besitzt, impliziert durch die Überproduktion in toleranten Zellkulturen und durch seine SM-abhängige Induktion und SM-komplexierende Eigenschaft, ließ sich an zwei weiteren Experimenten mit Zellsuspensionskulturen von Rauvolfia serpentina ersehen.

Durch Zugabe des spezifischen Inhibitors der Glutathionbiosynthese, Buthioninsulfoximin (Griffith und Meister 1979), konnte die Phytochelatininduktion stark (70 und 95%) reprimiert werden (Abb. 50). Mit Hemmstoff versetzte Kulturen zeigten keine Wachstumsunterschiede zu unbehandelten Kontrollen, solange sie nicht mit Schwermetallionen belastet wurden (vgl. Tab. 28). Nach Zugabe von Silberionen (35 µM) konnte eine deutliche Wachstums-einbuße als Ausdruck einer Intoxikation der Zelle beobachtet werden. Da der Effekt sowohl bei der niedrigeren Inhibitorkonzentration (0,2 mM) als auch bei der 10-fach höheren festzustellen war, wurde nicht eine Toxizität des Inhibitors dafür verantwortlich gemacht, sondern eine gesteigerte Sensitivität der Zellen gegenüber Schwermetallen bei eingeschränkter Fähigkeit zur Phytochelatinsynthese.

R. serpentina Zellen, die während der logarithmischen Wachstumsphase subletalen Konzentrationen an Kupferionen exponiert worden waren, reagierten auf diesen Streß mit einer sofortigen Einstellung des Wachstums und gleichzeitiger massiver PC-Synthese (Abb. 38). Nach Festlegung toxischer Ionen in den SM-bindenden PC-Molekülen, stagnierte der zelluläre PC-Anstieg und die Zel-

len erreichten eine der unbelasteten Kultur vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeit. Die zeitliche Kohärenz der Wachstumsinhibierung, erklärbar durch die Interaktion der toxischen Kupferionen mit dem Primärstoffwechsel der Zelle (Vallee und Ulmer 1972), und der erneuten Wachstumsaufnahme mit der Bildung der SM-abfangenden Peptide geben einen weiteren Anhaltspunkt für die Beteiligung von PC an der SM-Detoxifikation in der Pflanzenzelle.

Neben diesen an pflanzlichen Zellkulturen gewonnenen Hinweisen einer Schwermetalltoleranz durch Phytochelatine wurde eine Funktion in der Kupferresistenz differenzierter Pflanzen von Agrotis und Silene auch niedermolekularen, Cu-bindenden Proteinen zugeschrieben (Rauser 1984, Lolkema et al. 1984, Lolkema und Vooijs 1986). Diese Proteine wurden als Metallothioneine bezeichnet. Wie schon zuvor dargelegt (siehe D l.), konnten jene SM-bindenden Proteine nur unzulänglich gereinigt und charakterisiert werden, so daß auch diese 'Metallothioneine' durchaus Phytochelatine sein können. Eigene Untersuchungen ergaben keine Anhaltspunkte für induzierbare Metallothioneine in Pflanzen, vielmehr konnte gezeigt werden, daß 'Metallothioneine' oder 'Metallothionein-ähnliche' Proteine in Wirklichkeit Phytochelatin waren (Casterline und Barnett 1982, Rauser et al. 1983, Wagner und Trotter 1982, Wagner 1984). Zudem konnten Phytochelatine bzw. Cd-bindendes Peptidmaterial (wohl PC, siehe D l.) auch durch Kupfer induziert oder eine Cu-Bindung solcher Moleküle beobachtet werden (vgl. C 5.2., Bennetzen und Adams 1984, Robinson et al. 1986, Lue-Kim und Rauser 1986).

Eine Resistenz der Pflanzen bedingt durch Phytochelatine sollte eine unspezifische 'Co-Toleranz' für verschiedene Schwermetalle beinhalten, da eine Vielzahl von Metall-

ionen z.B. Cd, Zn, Pb, Cu, Ni und Hg diese Peptide induzieren, die wiederum solche Ionen komplexieren.

In der Tat gibt es Beispiele für mehrere Schwermetallresistenzen in einer Pflanze, obwohl kein entsprechender Selektionsdruck bestand. Eine auf stark Cu-haltigem Boden wachsende Pflanze, Mimulus guttatus, besaß gleichzeitig eine Toleranz gegen Zink, Blei und Nickel (Allan und Sheppard 1971). Auch zeigte eine ebenfalls Kupferresistente Alge Ectocarpus siliculosus eine erhöhte Zink- und Kobaltverträglichkeit (Hall 1980). Eine Co-Toleranz für Blei und Zink konnte beobachtet werden in dem Gras Deschampsia cespitosa mit einer multiplen Toleranz gegenüber Kupfer, Nickel und Aluminium (Cox und Hutchinson 1979). In Thlaspie goesingense wurde sowohl in Pflanzen normalversorgter Böden als auch von Serpentinstandorten eine Nickel-, Zink- und Kobalttoleranz nachgewiesen, die zusammen mit der Charakteristik der Metallaufnahme auf eine unspezifische, zelluläre Schwermetalldetoxifizierung schließen ließ (Reeves und Baker 1984). In Cd-resistenten Zellkulturen von Lycopersicon konnte eine parallele Resistenz gegenüber einer 1 mM Kupferkonzentration nachgewiesen werden, das entsprach einer etwa 10-fach erhöhten Toleranz gegenüber den Kulturen, die nicht das SM-bindende Peptid (PC) überproduzierten (Bennetzen und Adams 1984).

Diesen Befunden stehen Berichte einer gerichteten Schwermetallresistenz in Pflanzen gegenüber, spezifisch für das selektionierende Metall, wie sie z.B. in Agrostis tenuis und Silene cucubalus festgestellt wurde (Ernst 1974, Wu und Antonovics 1975).

Inwieweit tatsächlich Phytochelatin für die Schwermetallresistenz verantwortlich ist, kann nur durch Untersuchung des Schwermetall- und Phytochelatinmetabolismus in den jeweiligen Pflanzen geprüft werden. Mit dem Phytochelatinschnelltest (siehe B 7.) steht eine spezifi-

sche und effiziente Methode zur Klärung dieser Frage zur Verfügung. In einem ersten Experiment (Daten nicht gezeigt) wurde Silene cucubalus untersucht, die auf einer Zink-haltigen Abraumhalde am Rauschberg in Oberbayern wuchs (Abb. 58). Die Bodenanalyse ergab 2,9% Zink und Spuren von Kupfer und Cadmium von etwa 0,02%. Obwohl im Rohextrakt der Blätter ein deutlich erhöhter Anteil an Zink nachgewiesen wurden, konnte in der HPLC-Trennung keine substantielle Menge an PC identifiziert werden.



Abb. 58: Silene cucubalus auf einer zinkreichen Halde am Rauschberg bei Inzell (Oberbayern). In der Bodenanalyse konnten 2,9% Zink und Spuren von Kupfer und Cadmium festgestellt werden.

Die Gelfiltration des Rohextraktes belegte eine mehr als

90% Bindung der Zinkionen an niedermolekulare Substanzen (<1 kDa), damit wurden Befunde von Ernst (1974) und Mathys (1977) bestätigt, die eine Komplexierung der Zinkionen in Zn-toleranter S. cucubalus an niedermolekulare Verbindungen feststellten. Als Komplexbildner konnten Malat, Oxalat und Senföle erkannt werden (Mathys 1977), als Kompartiment der Zinkakkumulation die Vakuole. Eine Akkumulation von SM-Ionen in der Vakuole von Cd-belasteten Zellkulturen von Rauvolfia serpentina konnte nicht nachgewiesen werden. Nur ca. 1% des zellassoziierten Cd befand sich in der Vakuolenpräparation, hingegen 80% des Schwermetalls in der cytoplasmatischen Fraktion (vgl. C 8). Als Erklärung für die unterschiedliche SM-Akkumulation wäre eine SM-abhängige Kompartimentierung denkbar. Für Kupferionen ist ebenfalls eine cytoplasmatische Akkumulation beschrieben (Lolkema et al. 1984). Möglicherweise stellt die Zinkspeicherung in Silene die Ausnahme dar und ist der Resistenzmechanismus (Mathys 1977). Da die Zellkultur nur 3 Tage mit Cd belastet worden war, wäre noch zu prüfen, ob eine langfristige Speicherung der Schwermetalle nicht doch in Vakuolen stattfindet.

Jedoch gilt sicher, daß die Schwermetallionen durch Aufnahme in die Zelle zunächst in den cytoplasmatischen Raum gelangen. Experimentell klar belegt werden konnte, daß sich Phytochelatine in der cytoplasmatischen Fraktion der Pflanzenzelle befindet, durch eine Reihe von Schwermetallionen wie Cd, Pb, Zn und Hg induziert wird und diese bindet. Da außerdem in Schizosaccharomyces ein linearer Zusammenhang zwischen PC-Synthese und Cd-Menge über einen weiten Konzentrationsbereich (50 μ M–2 mM) gezeigt werden konnte, und überdies in Zellsuspensionskulturen bereits die im Medium befindlichen Zink- und Kupferionen (37 μ M Zn^{2+} , 0,1 μ M Cu^{2+}) PC induzieren, muß eine zumindest transiente Bindung der aufgenommenen Schwermetallionen an Phytochelatine postuliert werden.

Durch ein wirkungsvolles Abfangen toxischer Ionen im Cytoplasma ließen sich Störungen im zellulären Stoffwechsel und damit auch Wachstumsinhibierung weitgehend vermeiden. SM-resistente Pflanzen könnten sich gegenüber 'Normal'-Formen durch eine gesteigerte Synthesekapazität für cytoplasmatische, SM-bindende Moleküle auszeichnen und somit diese Ionen effizienter komplexieren. Für diese Vorstellung spricht die erhöhte Synthese an Phytochelatin in Cd-resistenten, pflanzlichen Zellkulturen, als auch an niedermolekularen, Cu-bindenden Proteinen in toleranten Pflanzen von Silene und Agrostis.

Wenngleich eine Beteiligung von Phytochelatin an der Schwermetallresistenz in Zellkulturen eindeutig ist, zeigen die verschiedenen beschriebenen Resistenzmechanismen, wie Zellwanddeposition, Ionenausschluß, Kompartimentierung in Vakuolen usw., in differenzierten Pflanzen, daß diese Peptide nur eine weitere Facette der vielfältigen Mechanismen sein können. Aufgrund ihrer Ubiquität jedoch spielen Phytochelatine möglicherweise ganz allgemein eine Rolle in der Schwermetalltoleranz der Pflanzen.

3. Phytochelatin im Vergleich zu Metallothionein

Induzierbare, Schwermetall-bindende Peptide oder niedermolekulare Proteine existieren in Prokaryonten wie Pseudomonas und Escherichia (Higham et al. 1984, Khazaeli und Mitra 1981) und Eukaryonten. Die weite Verbreitung SM-komplexierender Moleküle mag auf die geringe Selektivität der SM-Aufnahme der Lebewesen zurückzuführen sein, die ein Regulativ für physiologisch wirksame SM-Ionen in der Zelle erfordert. Eine solche Funktion kann durch spezifische, zelluläre Bindung von SM erfüllt werden. In Eukaryonten entwickelten sich zwei weitverbreitete Systeme der SM-Komplexierung; nämlich Metallothioneine im Tierreich, und Phytochelatine im Pflanzenreich. Beide Systeme sollen nachstehend miteinander verglichen werden.

Struktur und Metallbindung:

Metallothioneine bilden einen Komplex mit Schwermetallionen. Verantwortlich für die Bindung der Metallionen ist eine cysteinreiche Peptidkette von 25 Aminosäuren bei Neurospora bis knapp über 60 bei Säugern. Über die Sulfhydrylgruppen der Cysteine, häufig in Cys-X-Cys oder Cys-Cys Anordnung auf der Primärstruktur zu finden, werden die Ionen als Thiolat-Komplex gebunden. Im Säuger-MT werden 7 zweiwertige Metalle wie Zn^{2+} oder Cd^{2+} , bzw. 12 einwertige Kupferionen über 20 Sulfhydryl-Gruppen komplexiert (MT betreffende Daten sind, wenn nicht eigens erwähnt, aus Kägi und Nordberg, 1979, entnommen).

Phytochelatine sind homologe Peptide von vorwiegend unter 10 Aminosäuren Kettenlänge. Sie stellen die Unter-einheiten zweier pflanzlicher Schwermetallkomplexe von 3,6 und 2,5 kDa dar. Die Moleküle sind ungewöhnlich anionisch und schwefelhaltig, wie aus ihrer Primärstruktur hervorgeht, die aus einer alternierenden Abfolge von γ -Glutamyl- und Cysteinylresten mit einem carboxytermi-

nalen Glycin oder, im Falle der Homo-Phytochelatine, mit einem C-terminalen β -Alanin. Eine solche Aminosäuresequenz wurde in Phytochelatinmolekülen von 5 bis 23 Aminosäuren nachgewiesen, das entspricht einem Molekulargewicht von 539 bis 2627 Da. Formal besitzen Phytochelatine ebenfalls eine Cys-X-Cys Struktur, die sich jedoch aufgrund der dazwischen liegenden γ -Glutamylgruppe durch einen deutlich größeren Abstand gegenüber einer alpha-Carboxylbindung unterscheidet. Die SM-Ionen werden ebenfalls über einen Thiolat-Komplex gebunden wie aus einem ähnlichen UV-Absorptions- und CD-Spektrum (Abb. 59) von Cd-PC und Cd-MT zu ersehen ist. Mit einer Cd-SH-Ligandierung im Einklang, zeigen beide Komplexe eine nahezu identische Absorption im UV-Bereich mit einer Schulter im Spektrum bei etwa 250 nm und einem molaren Absorptionskoeffizienten von $1,65 \cdot 10^4$ für MT und $3,8 \cdot 10^4$ $\text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bezogen auf den 3,6 kDa PC-Komplex bei 245nm.

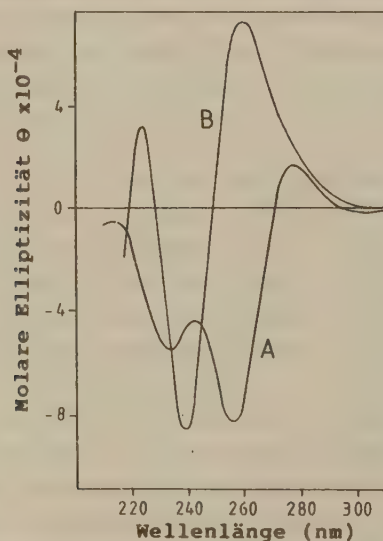


Abb. 59: Vergleich der CD-Spektren von Cd-Phytochelatin-Komplex aus Rauvolfia serpentina und Cd-Metallothionein aus Ratte (Rupp und Weser 1978)

Im CD-Spektrum von PC ist eine Verschiebung der Cotton-Extrema von 10-20 nm in den längerwelligen Bereich gegenüber MT zu erkennen (Abb. 59), aber auch ein zusätzliches negatives Maximum bei 232 nm (Tab. 31), das in Isolaten aus Agrostis und Lycopersicon (Rauser et al. 1983, Lue-Kim und Rauser 1986) nur als Schulter angedeutet war (vergleiche Abb. 57). Über die Cysteinreste von PC, mit einem Aminosäureanteil von 40-48% Molprozenten, waren die Cd-Ionen im Verhältnis von ein 1 Cd:2,4 SH-Gruppen komplexiert (Tab. 5). Im Cd-rekonstituiertem Phytochelatin-komplex betrug die Relation sogar 1:2,0, so daß angesichts möglicher Metallverluste während der PC-Isolation, ein Bindungsverhältnis von 1:2 im nativen Komplex angenommen werden muß (Kapitel C 3.2.). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Kägi und Bernhard (1986) mit Isolaten aus Mais, etwa 1:2, und Lue-Kim und Rauser (1986) mit einer Präparation aus Tomatenwurzeln mit 1:2,3. Damit unterscheidet sich Phytochelatin eindeutig im Cd/SH-Verhältnis gegenüber Säuger-MT, das eines von 1:3 besitzt. Für Pb-PC konnte nur ein geringfügig niedrigere (10%) Metall-Cystein-Relation im Vergleich zu Cd-PC ermittelt werden, dagegen wick Cu-PC mit einem annähernd doppelt so hohen molaren Kupfergehalt deutlich davon ab (Tab. 21). Obwohl diese beiden Bestimmungen jeweils nur an einem Isolat durchgeführt wurden und deshalb mit einer größeren, experimentellen Streuung gerechnet werden muß, weisen die Daten für Blei auf eine 1:2 Stöchiometrie, für Kupfer auf eine dem Cu-(I)-MT aus Neurospora (Lerch 1980) entsprechende Relation von etwa 1:1. Daher liegen möglicherweise auch im PC-Molekül die Kupferionen in einwertiger Form vor. Das günstigere Metall/Sulfhydryl-Verhältnis der Phytochelatine gegenüber Säuger-MT könnte auf einer zusätzlichen Ligandierung der Schwermetalle durch die zahlreichen Carboxylgruppen (Glutamat 40-48 Mol%) und/oder durch die freie Aminogruppe der PC-Peptide beruhen. Eine solche Komple-

xierung ist für einen Eisen- bzw. Kupfer-Cystein-Komplex beschrieben (Jocelyn 1972) und könnte auch an der Rotverschiebung der CD-Spektren beteiligt sein. In Säuger-MT ist außer der Sulfhydryl-Ligandierung der Ionen kaum eine weitere möglich, denn in der Primärstruktur sind nur wenige saure Aminosäuren (7-8 Mol%) und der Amino-terminus ist N-acetyliert.

Die effizientere Weise der Schwermetallkomplexierung von PC bei gleichzeitig höherem Cysteingehalt (30-35 Mol% Cys in MT, 40-48 Mol% in PC) zeigt sich in einem deutlich höheren Metallgehalt von PC. Präparationen pflanzlicher, SM-haltiger PC-Komplexe wiesen einen Gewichtsanteil von 14,5% Cd, 21,7% Pb, 16,5% Cu und 4,6% Zn auf. Der molare Zinkgehalt entsprach nur etwa halb dem von Cadmium, vermutlich ein Isolationsartefakt bedingt durch die etwa 1000-fach geringere Stabilität von Zink- gegenüber Cadmiumthiolaten (Hamer 1986). Aus Schizosaccharomyces isoliertes PC besaß einen Cd-Gehalt von 15,6% (C 6.l.). In Isolaten aus differenzierten, Cd-belasteten Pflanzen wurde ein SM-Anteil von 11% Cd bei Agrostis bestimmt (Rauser et al. 1983) und von 7,7% Cd, neben 0,12% Zn und 1,3% Cu bei Lycopersicon (Lue-Kim und Rauser 1986). Das Cd-PC aus Zellkultur von R. serpentina lag praktisch als reiner Cd-Peptid-Komplex vor. Es konnten nur Spuren von Zink und Kupfer (jeweils 0,03 Gewichtsprozent) festgestellt werden. Dagegen enthielt Cd-MT isoliert aus Pferdeniere 5,9% Cd und substantielle Mengen an Zn (2,2%), Fe (0,45%) und Cu (0,18%) (Kägi und Vallee 1961). Ein reiner Cd-Komplex war nur nach Rekonstitution von Apo-MT mit Cadmium zu erhalten. Der Metallgehalt lag bei 11,4% Cd.

Induktion und Biosynthese:

Wie die Metallanalysen bereits dokumentierten, werden Cd, Cu, Pb und Zn durch Phytochelatin komplexiert. Diese Metallionen vermögen auch die PC-Synthese auszulösen.

	Phytochelatin	Metallothionein ^a
Struktur:		
Peptidlänge	5-23 Aminosr.	61 (62) Aminosr.
Aminosäuren	3 verschiedene	13-14
Molgewicht	539-2627 Da	ca. 6100 Da
Cys-Gehalt	40-48 Mol%	32-33 Mol%
Cys-Anordnung	Cys-γ-Glu-Cys	Cys-X-Cys, Cys-Cys
Metall-Komplex	3,6 kDa, 2,5 kDa	6,5 - 7 kDa
Untereinheiten	ja	nein
Metallbindung:		
	Cd-PC	Cd-MT
Metallgehalt(%)	14,5-15,6, 18,7 ^b	11,4 ^b
Cd/SH-Gruppe	1:2	1:3
Mol. Extinktions- koeffizient _{245nm}	3,8·10 ⁴ c	1,65·10 ⁴
CD-Spektrum	+278 nm, +215 ^d nm	+257 nm, +224
(Maxima)	-257 nm, -232 nm	-240
Induktion:		
Schwermetalle	Zn, Cd, Hg, Cu, Ag, Au, Pb,	Zn, Cd, Hg, Cu, Ag, Au, Pb,
bzw. andere	Sn, As, Sb, Bi, Se,	Interferon, Gluco-
Agentien	Te, Ga, Ni, W	corticoidhormone
Biosynthese:		
	nicht ribosomal	ribosomal
	kein Gen	Gene
	Polymerisation von	Transkription
	Glutathion oder Glu-	und Translation
	tamylcystein	
Funktion:		
	Detoxifizierung und Homöostase ^e von Schwermetallen	

Tab. 31: Vergleich von Phytochelatin mit Metallothionein

^a Säuger-MT ; ^b rekonstituiert ; ^c auf 3,6 kDa bezogen ;

^d manchmal als negatives Minimum ausgeprägt ; ^e postuliert ;

Systematische Untersuchung der PC-induzierenden Metalle ließen erkennen (Tab. 22 und 23), daß nur Elemente des Periodensystems, die ein mit Elektronen voll besetztes d^{10} -Orbital in der vorletzten Hauptschale besitzen, allgemein in der Lage sind, die Phytochelatine zu induzieren. Eine Ausnahme dieser Regel bildet soweit bekannt Wolfram. Nickel kann als ein Element mit aufgefülltem d-Orbital und unbesetzter äußerer Hauptschale betrachtet werden. So sind die Elemente der Nebengruppe IB Cu-Ag-Au und IIB Zn-Cd-Hg, aber auch der Hauptgruppe III Ga-In(?) - Tl(?) (Elemente mit Fragezeichen wurden nicht getestet), IV Ge(?) - Sn-Pb, V As-Sb-Bi, VI Se-Te-Po(?) PC-induzierend. Die Schwermetalle As, Se wurden als Arsenit oder Arsenat und Selenit angeboten. In welcher Form sie in der Zelle vorliegen, kann nicht beantwortet werden, doch besitzen die Verbindungen eine hohe Affinität zu SH-Gruppen (Jocelyn 1972). Dieser Befund weist auf eine nicht zwingend kationische Form der Induktoren, sondern möglicherweise auf eine allein durch die SH-Affinität bedingte Induktion. Mit dieser Annahme im Einklang steht die PC-Induktion durch Ellman-Reagens (5,5'-Dithiobis-2,2'-nitrobenzoesäure) (Abb. 36E). Eine diesem Befund vergleichbare Induktion von Metallothionein mit Jodessigsäure und anderen S-alkylierenden Substanzen konnte beobachtet werden (Kotsonis und Klaassen 1979, Heilmaier 1986). Die Mechanismen, die zu dieser Induktion führen, sind keineswegs geklärt. Das gilt auch für die SM-abhängige MT-Induktion, an der, soviel ist bekannt, SM-spezifische DNA-Regulationssequenzen beteiligt sind (Karin et al. 1984). Über diese Regulationselemente wird offensichtlich der Säuger MT-Promoter durch SM-Ionen wie Cd, Zn, Cu, Pb, Hg, Ag und Au induziert (Kägi und Nordberg 1979, Webb und Cain 1982), Metallionen, die auch Phytochelatine induzieren. Unmittelbar nach Schwermetallbelastung z.B eines Tieres setzt die MT-Synthese ein, die eine maximale Bildungsgeschwindigkeit nach 4-10

Stunden erreicht. Eine Transkription der MT-mRNA wurde in Zellkulturen bereits wenige Minuten nach Metallzugabe festgestellt, mit der höchsten Konzentration an dieser mRNA nach 4-6 Stunden (Hamer 1986). In pflanzlichen Zellkulturen konnte ebenfalls eine sofortige Synthese von Phytochelatin nach Cd- oder Cu-Belastung beobachtet werden (Abb. 37 und 48). Soweit erkennbar, erfolgte die Induktion ohne Verzögerung und mit nahezu konstanter Syntheserate. Das kann auf einer unzureichenden Auflösung eines schnellen Induktionsvorganges (Messung nach 15 und 30 Minuten) oder auf einer konstitutiven Synthesekapazität der Zellen beruhen. Eine direkte Regulation der PC-Synthese auf der Ebene der Transkription, wie bei MT, oder Translation ist ausgeschlossen, denn Phytochelatine können aufgrund ihrer repetitiven γ -Glutamylreste nicht ribosomal synthetisiert werden. Der polymere Aufbau der Moleküle aus tandemartig angeordneten γ -Glu-Cys-Einheiten und der Nachweis von Homo-Phytochelatin in Homo-Glutathion enthaltenden Pflanzen, mit Substitution des C-terminalen Glycins durch β -Alanin, ließen auf eine Beteiligung von Glutathion bzw. Homo-Glutathion an der PC-Synthese schließen (siehe D 1.). Zwei weitere Beobachtungen unterstützen diese Vorstellung.

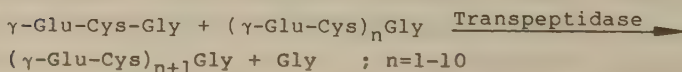
Zugabe von Buthioninsulfoximin, eines spezifischen Hemmstoffs der γ -Glutamylcysteinsynthetase (Griffith und Meister 1979), führte zu einer drastischen Minderung der PC-Synthese (Abb. 50). Rauvolfia serpentina Zellen zeigten in Gegenwart von 0,2 und 2 mM Inhibitor nach Schwermetallbelastung mit verschiedenen Ag^+ -Konzentrationen nur noch etwa 30 bzw. 10% der PC-Synthese im Vergleich zu Kulturen ohne Buthioninsulfoximin. Da keine Toxizität des Hemmstoffs beobachtet werden konnte, ist aus diesem Versuch die grundlegende Beteiligung von Glutamylcystein oder Glutathion, dem Endprodukt des inhibierten Syntheseweges, zu ersehen.

In einem weiteren Experiment mit Zellsuspensionskulturen

ließ sich mit Zugabe von Cd^{2+} ein sofort einsetzender, linearer Abfall der zellulären GSH-Konzentration auf etwa 40% des anfänglichen Wertes in den ersten 3 Stunden verfolgen. Parallel dazu fand ein Einbau von γ -Glutamylcysteinyl-Resten in PC statt, der ca. 80% des Verlustes im GSH-'Pool' entsprach (Abb. 48). Da eine GSH-Präzipitation durch Cd-Ionen unter den Analysebedingungen (vgl. C 7.1.) ausgeschlossen werden konnte, weist gerade dieses Ergebnis auf eine PC-Bildung unter Verbrauch von GSH. Ob dabei das Tripeptid direkt, oder nach Entfernung des C-terminalen Glycins in der Synthese verwendet wird, ist nicht zu entscheiden. Aus dem zeitlichen Verlauf der PC-Induktion war in den ersten 2 Stunden eine nahezu ausschließliche Synthese von PC_2 (ca. 85% der Glu-Cys-Einheiten) zu ersehen. Anschließend stagnierte die zelluläre Konzentration an PC_2 und gleichzeitig wurde verstärkt PC_3 gebildet. In Schizosaccharomyces konnte die gleiche Beobachtung gemacht werden (Abb. 46). Somit deuten beide Versuche auf eine Umsetzung von GSH zu PC_2 , das seinerseits, formal durch Addition einer weiteren γ -Glutamylcysteinyl-Gruppe, zu PC_3 umgesetzt wird. Nachdem sich alle PC-Monomere nur in der Anzahl der Dipeptidylreste unterscheiden, ist es möglich, die Beteiligung nur eines einzigen Enzyms anzunehmen. Zwei einfache Modelle sind unter dieser Annahme vorstellbar:

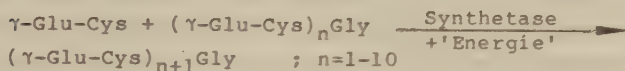
Eine Synthese durch Transpeptidierung ist denkbar, in der unter Aufhebung der Peptidbindung zwischen Cys-Gly ein GSH-Molekül auf $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $n=1-10$, übertragen wird (A). Für diese Reaktion wäre keine 'Energie' erforderlich, denn eine Peptidbindung zu Glycin würde gelöst und dafür eine neue geknüpft.

A:



Ein zweites Modell ist eine Synthetasereaktion durch Aktivierung eines Glutamylcysteinyl-Restes, z.B. durch ATP (B).

B:



Eine analoge Enzymreaktion katalysiert die Glutathion-Synthetase, die einen aktivierten Glutamylcysteinyl-Rest auf Glycin überträgt. Beide Modelle (A und B) wären im Einklang mit den hier vorgestellten Befunden der Glutathionbeteiligung an der PC-Synthese. Sie ließen sich jedoch durch spezifische Inhibierung der GSH-Synthetase in SM-belasteten Pflanzen unterscheiden. Wie auch immer die Antwort ausfallen mag, an der entscheidenden Beteiligung des GSH-Stoffwechsels in der PC-Synthese ist nicht zu zweifeln. Eine PC-Induktion sollte daher auch die GSH-Synthese induzieren, wie auch aus einzelnen Versuchen hervorgeht. In Rosa canina Zellkulturen konnte ein 6-7 facher Anstieg der zellulären SH-Konzentration nach 200 μM Cd-Belastung verfolgt werden (Abb. 7). Hier wurde nur der gesamte Sulfhydrylgehalt der Zelle einschließlich Cystein, Glutathion und PC gemessen. Eine GSH-Bestimmung in R. serpentina Zellen ergab einen Wert von 7 $\mu\text{Mol/g}$ TG (Abb. 48). In 100 μM Cd^{2+} -exponierter R. serpentina wurde nach 3-tägiger Belastung 20 μMol Glu-Cys/g TG allein in PC-Peptiden festgestellt, in Rosa Zellen (200 μM Cd, 3 Tage) fast 30 μMol Glu-Cys/g TG in PC (Abb. 37). Damit ergibt sich in erster Näherung ein 4-5 facher, zellulärer Anstieg der $\gamma\text{-Glu-Cys}$ -Reste in den ersten 3 Tagen der Schwermetallexposition. Folglich muß der Syntheseweg von GSH, aber vermutlich auch der beteiligten Aminosäuren, insbesondere von Cystein, stark induziert werden.

Mit dieser außergewöhnliche PC-Synthese ist ein weiteres

Beispiel der wenigen, nicht ribosomalen Peptidsynthesen bekannt geworden. Eine solche Synthese ist neben GSH auch für cyclische Peptidantibiotika wie Gramacidin und Tyrocidin (Lehninger 1972) und bakterielle Zellwandpeptide (Mandelstam und McQuillen 1973) beschrieben. Kennzeichnend für diese Synthesen sind D-Aminosäuren in der Sequenz, cyclische Peptide, β -Aminosäuren oder γ -Peptidbindungen (Lehninger 1972). D-Aminosäuren konnten in Phytochelatin nicht nachgewiesen werden (vgl. C 3.4), aber β -Alanin in Homo-Phytochelatin und γ -Peptidbindungen. Die γ -Glutamylbindungen im PC-Molekül und damit auch das Fehlen eines PC-kodierenden Gens sind die grundlegenden Unterschiede zu MT.

Funktion:

Neben diesem tiefgreifenden Unterschied in der Biosynthese von PC und MT, zeichnet sich eine gemeinsame Funktion beider SM-bindenden Moleküle ab.

MT wurde eine zelluläre Aufgabe in der Detoxifizierung und Homöostase von Schwermetallen zugeschrieben (Kägi und Nordberg 1979). Wenngleich bis heute nur die entgiftende Wirkung der MT klar belegt werden konnte (siehe D 2), werden die Proteine auch als Speicher für Zink- und Kupferionen zur Regulation des zellulären SM-Haushalts gesehen (Kägi und Nordberg 1979, Hamer 1986).

Phytochelatine als Speicher physiologischer Schwermetalle in Pflanzenzellen aufzufassen, könnte nachfolgende Beobachtung erklären. Transfer von Suspensionskulturen in frisches Nährmedium von Linsmaier und Skoog (1965) mit 'physiologischen' Konzentrationen an Zink ($37\mu\text{M}$) und Kupfer ($0,1\mu\text{M}$) führte zu einer PC-Induktion ($0,8\mu\text{Mol Glu-Cys/g TG}$ nach 3 Tagen). Im Laufe der Kultivierung sank der PC-Gehalt der Kultur von $6\mu\text{Mol Glu-Cys/l}$ auf ca. $3\mu\text{Mol Glu-Cys/l}$ nach weiteren 4 Tagen der Kultivierung. Dieser Rückgang des PC-Gehaltes der Kultur ist nur mit einem PC-Abbau zu vereinbaren. Ein Abbau von PC mit

komplexierten Zn- oder Cu-Ionen sollte zur Freisetzung der physiologischen Metalle führen und könnte dem Bedarf der wachsenden Zelle an essentiellen Schwermetallen (siehe Einleitung) angepaßt sein. Eine Regulation des Schwermetallhaushaltes in der Pflanze erfordert SM-bindende Moleküle. Nachdem Phytochelatin als die induzierbare und klar dominierende SM-bindende Substanz der Pflanze erkannt wurde, ist allein deshalb schon eine Beteiligung der Peptide in der Homöostase physiologischer Schwermetalle zu postulieren. Eine Rolle der PC in der Schwermetall-Entgiftung konnte bereits durch die Überproduktion von PC in Cd-resistenten Zelllinien belegt werden (siehe D 2.). Auf eine solche Funktion wiesen ebenfalls die zeitliche Korrelation von Wachstumshemmung und PC-Sythese und die erhöhte Empfindlichkeit der Pflanzenzellen gegenüber Schwermetallen mit inhibierter PC-Synthese.

Phytochelatine und Metallothionein sind eine phylogenetisch analoge, aber nicht homologe Entwicklung insofern, als beide Molekülklassen einen hohen Cysteingehalt besitzen, Schwermetalle durch Mercaptidbindung komplexieren und eine Funktion in der Entgiftung und vermutlich auch in der Homöostase von Schwermetallen erfüllen, aber im Weg der Synthese völlig differieren: Phytochelatine werden durch Polymerisation von Di- oder Tripeptiden gebildet, Metallothionein durch Translation von Nukleinsäuren an Ribosomen.

Induzierbare, Schwermetall-bindende Peptide konnten aus pflanzlichen Zellkulturen und differenzierten Pflanzen isoliert, charakterisiert und sequenziert werden. Die Peptide mit einer Kettenlänge von 5-23 Aminosäuren zeigten eine homologe Primärstruktur bestehend aus repetitiven γ -Glutamylcysteinyl-Einheiten mit einem carboxyterminalen Glycin. Die neue Substanzklasse wurde als Phytochelatin bezeichnet. Phytochelatin konnte als das Schwermetall-bindende Prinzip der höheren Pflanzen erkannt werden. Die Beteiligung von Glutathion an der Biosynthese von Phytochelatin wurde gezeigt und eine zelluläre Funktion dieser Peptide in der Detoxifizierung und Homöostase von Schwermetallen in der Pflanze diskutiert.

1. In Zellsuspensionskulturen von Rauvolfia serpentina bzw. Rosa canina konnte ein durch Cadmium stark induzierbares Peptidmaterial mit hohem Cadmium- und Sulfhydrylgehalt nachgewiesen werden. In zellfreien Rohextrakten von Cd-belasteten R. serpentina Zellen waren mehr als 90% des darin nachweisbaren Cadmiums mit jener induzierbaren Substanz assoziiert. Reinigung dieses Cd-bindenden Materials durch DEAE-Chromatographie, Ammonsulfatfällung, Ultrafiltration und Gelfiltration führte zu einem mehr als 98% reinen Produkt mit einer Ausbeute an Cadmium von 50-60%. Aus 1 kg Cd-exponiertem Gewebe (Frischgewicht) wurden 100-200 mg Peptidmaterial isoliert.

2. Die Charakterisierung des Cd-Komplexes durch UV-Absorptions- und CD-Spektrum belegte eine Cd-Thiolat-Bindung. Der Metallgehalt lag bei 14,5 Gewichtsprozent und eine Cadmium/Sulfhydryl-Relation von 1:2 konnte gezeigt werden. Durch Gelfiltration ließen sich 2 Cd-

Komplexe mit 3,6 kDa und 2,5 kDa Molekulargewicht nachweisen. Das Peptidmaterial wies neben 10-11 Molprozenten Glycin nur L-Cystein und äquimolare Mengen an L-Glutamin bzw. L-Glutaminsäure auf. Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie des Cd-bindenden Materials unter Metall-dissoziierenden Bedingungen führte zu einer Trennung in mehrere Peptidkomponenten.

3. In Versuchen, die Peptide durch Edmanabbau zu sequenzieren, konnte keine Aminosäure abgespalten werden, da ein γ -Glutamylrest jeweils den Aminoterminus bildete. Als carboxyterminale Aminosäure wurde durch Hydrazinolyse ausschließlich Glycin identifiziert. Die Primärstruktur der Peptide $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$, $n=2-11$, wurde auf zwei unabhängigen Wegen, durch enzymatischen und chemischen Abbau und durch Partialhydrolyse ermittelt. Diese Schwermetall-bindenden Peptide mit einer Kettenlänge von 5-23 Aminosäuren wurden als Phytochelatine bezeichnet. Die γ -Peptidbindungen in den Primärstrukturen implizierten, daß Phytochelatine nicht an Ribosomen synthetisiert werden können und somit keine entsprechenden Gene existieren. Vielmehr deuteten die repetitiven $\gamma\text{-Glu-Cys}$ -Einheiten auf die Beteiligung von Glutathion an der Biosynthese der homologen Peptide. Dies wurde durch zwei Beobachtungen bestätigt: Spezifische Inhibierung der Glutathionbiosynthese führte gleichzeitig zu einer Hemmung der Phytochelatinbiosynthese, und die Induktion von Phytochelatin war in der Anfangsphase mit einem Abfall der zellulären Glutathionkonzentration korreliert.

4. Im Einklang mit einer Phytochelatin-Biosynthese unter Glutathionverbrauch wurden in Sojabohne, einer Pflanze, die statt Glutathion Homo-Glutathion (das Glycin von Glutathion ist durch β -Alanin ersetzt) enthält, Homo-Phytochelatine isoliert und sequenziert, der allgemeinen Strukturformel $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\beta\text{-Ala}$ entsprechend.

5. Phytochelatine ließen sich nicht nur in Zellkulturen von Gymnospermen und Angiospermen durch Cadmium induzieren, sondern auch in differenzierten Pflanzen wie Tomate, Wasserhyazinthe oder Rotkohl. Metallothioneine oder Metallothionein-ähnliche Proteine, wie von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, konnten nicht nachgewiesen werden. Ein angeblich 10 kDa, Metallothionein-ähnliches und Cd-bindendes Protein aus Rotkohl ließ sich eindeutig als Phytochelatin identifizieren. Die Diskrepanz im Molekulargewicht war durch eine ausgeprägte Abhängigkeit des apparenten Molekulargewichts von der Ionenstärke zu erklären.

6. Neben Cd^{2+} vermochten Schwermetallionen wie Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Au^+ , Sb^{3+} , Ni^{2+} , aber auch Anionen wie Arsenat und Selenit die Phytochelatinsynthese in Zellsuspensionskulturen von Rauvolfia serpentina und Rosa canina zu induzieren. Die Bindung von Blei, Zink, und Kupfer an Phytochelatin konnte durch Isolierung der entsprechenden Metallkomplexe belegt werden, für die anderen induzierenden Ionen wurde eine Komplexierung an Phytochelatin postuliert.

7. Eine den Pflanzen qualitativ identische 'Phytochelatin-Familie' konnte in der Spaltheife Schizosaccharomyces pombe nachgewiesen werden, nicht hingegen in der Hefe Saccharomyces cerevisiae, die ein schon bekanntes Metallothionein-Gen besitzt.

8. Die Ubiquität der Phytochelatine im Pflanzenreich und die Rolle dieser Schwermetall-bindenden Peptide in der Schwermetalltoleranz der Pflanze wurden diskutiert. Auch eine zelluläre Aufgabe der homologen Peptide in der Detoxifizierung und Homöostase von Schwermetallen wurde anhand der Ergebnisse erwogen. Aufgrund der Schlußfolgerungen in der Diskussion wurden Phytochelatine und Me-

tallothioneine als analoge Entwicklungen der Schwermetallkomplexierung in Pflanze und Tier gesehen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Allan W.R., Sheppard P.M. (1971)
Copper tolerance in some Californian populations of the monkey flower, Mimulus guttatus. Proc. Roy. Soc. London, Serie 'B', 177, 177-196
- Ambler R.P. (1972)
Enzymatic hydrolysis with carboxypeptidases. In: Methods in Enzymology, 25, 143-154; Hirs C.W.H., Timasheff S.N., Edit., Academic Press, New York
- Antonovics J., Bradshaw A.D., Turner R.G. (1971)
Heavy-metal tolerance in plants. Adv. Ecol. Res. 7, 1-85
- Bartolf M., Brennan E., Price C.A. (1980)
Partial characterization of a cadmium-binding protein from the roots of a cadmium-treated tomato. Plant. Physiol. 66, 438-441
- Baumeister W. (1967)
Schwermetallpflanzengesellschaften und Zinkresistenz einiger Schwermetallpflanzen. Angew. Botanik 40, 185-204
- Baumeister W., Ernst W. (1978)
Mineralstoffe und Pflanzenwachstum. G. Fischer Verlag, New York
- Beach L.R., Palmiter R.D. (1981)
Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium-resistant mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2110-2114
- Bennetzen J.L., Adams T.L. (1984)
Selection and characterization of cadmium-resistant suspension cultures of the wild tomato Lycopersicon esculentum. Plant Cell Rep. 3, 258-261
- Bensadoun A., Weinstein D. (1976)
Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal. Biochem. 70, 241-250
- Bergmayer H.U. (1974)
Methoden der enzymatischen Analyse. Band II, Verlag Chemie, Weinheim
- Bernhard W.R. (1986)
Spektroskopische und proteinchemische Studien an tierischen und pflanzlichen Metallothioneinen. Dissertation, Universität Zürich
- Bernhard W.R., Kägi J.H.R. (1986)
Purification and partial characterization of atypical cadmium-binding polypeptides from Zea mays. In: Metallo-

thionein 2, Kägi J.H.R. und Kojima Y., Edit., Birkhäuser Verlag, Basel

Boulanger Y., Goodman C.M., Forte C.P., Fesik S.W., Armitage I.M. (1983)

Model for mammalian metallothionein structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1501-1505

Bradford M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

Brenner M., Niederwieser A., Pataki G. (1961)

Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäurederivaten auf Kieselgel G. Experientia 17, 145-153

Broda E., Findenegg G.R. (1966)

Spezifität der Zinkaufnahme durch Chlorella. Experientia 23, 18-19

Brooks A., Collins J.C., Thurman D.A. (1981)

The mechanism of zinc tolerance in grasses. J. Plant Nutrition 3, 695-705

Bühler R.H.O., Kägi J.H.R. (1974)

Human hepatic metallothioneins. FEBS Lett. 39, 229-234

Butt T.R., Sternberg E.J., Gorman J.A., Clark P., Hamer D., Rosenberg M., Crooke S.T. (1984)

Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3332-3336

Carnegie P.R. (1963)

Isolation of a homologue of glutathione and other acidic peptides from seedlings of Phaseolus aureus. Biochem. J. 89, 459-471

Casterline J.L., Barnett N.M. (1977)

Isolation and characterization of a cadmium-binding component in soybean plants. Plant Physiol. 59, Suppl. 124

Casterline J.L., Barnett N.M. (1982)

Cadmium-binding components in soybean plants. Plant Physiol. 69, 1004-1007

Cataldo D.A., Garland T.R., Wildung R.E. (1981)

Cadmium distribution and chemical fate in soybean plants. Plant Phys. 68, 835-839

Cataldo D.A., Garland T.R., Wildung R.E. (1983)

Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. Plant Phys. 73, 844-848

- Chang J.-Y., Brauer D., Wittmann-Liebold B. (1978)
Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-NN-dimethylaminoazobenzene 4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Lett.* 93, 205-214
- Chang J.-Y. (1983)
Manual micro-sequence analysis of polypeptides using dimethylazobenzene isothiocyanat. In: *Methods in Enzymology*, 91, 455-466; Hirs C.W.H., Timasheff S.N., Edit., Academic Press, New York
- Compere S.J., Palmiter R.D. (1981)
DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells. *Cell* 25, 233-240
- Connell G.E., Adamson E.D. (1970)
 γ -Glutamyltranspeptidase. In: *Methods in Enzymology*, 19, 782-789; Perlmann G.E., Lorand L., Edit., Academic Press, New York
- Cox R.M., Hutchinson T.C. (1979)
Metal co-tolerance in the grass *Deschampsia cespitosa*. *Nature* 279, 231-233
- Deus-Neumann B., Zenk M.H. (1984)
A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta* 162, 250-260
- Durnam D.M., Perrin F., Gannon F., Palmiter R.D. (1980)
Isolation and characterization of the mouse metallothionein-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6511-6515
- Ellman G.L. (1959)
Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77
- Ernst W. (1974)
Schwermetallvegetation der Erde. G. Fischer Verlag, Stuttgart
- Fogel S., Welch J.S. (1982)
Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5342-5346
- Frankel M., Gerstner D., Jacobson H., Zilkha A. (1960)
Synthesis of poly-S-alkyl-L-cysteines. *J. Chem. Soc. (London)* 1960, 1390-1393
- Friedman R.L., Stark G.R. (1985)
 α -Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* 314, 637-639

Fujita M. (1985)

The presence of two Cd-binding components in the roots of water hyacinth cultivated in Cd²⁺-containing medium. *Plant Cell Physiol.* 26, 295-300

Furey W.F., Robbins A.H., Clancy L.L., Winge D.R., Wang B.C., Stout C.D. (1986)

Crytal structure of Cd, Zn metallothionein. *Science* 231, 704-710

Gamborg O.L., Müller P.A., Ojima K. (1968)

Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50, 151-158

Gick G.G., McCarty K.S. (1982)

Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium- and zinc-resistant chinese ovary cells. *J. Biol. Chem.* 257, 9049-9053

Gregory R.P.G., Bradshaw A.D. (1965)

Heavy-metal tolerance in populations of *Agrostis tenuis* Sibth. and other grasses. *New Phytol.* 84, 631-647

Griffith B.B., Walters R.A., Enger M.D., Hildebrand C.E., Griffith J.K. (1983)

cDNA cloning and nucleotide sequence comparison of chinese hamster metallothionein I and II mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 11, 901-910

Griffith O.W. (1981)

Depletion of glutathione by inhibition of biosynthesis. In: *Methods in Enzymology*, 77, 59-63; Jacoby W.B., Edit., Academic Press, New York

Griffith O.W., Meister A. (1979)

Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine. *J. Biol. Chem.* 254, 7578-7560

Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H., (1985a)

Phytochelatin: The principal heavy metal-complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 574-576

Grill E., Zenk M.H., Winnacker E.-L., (1985b)

Induction of heavy metal-sequestering phytochelatin by cadmium in cell cultures of *Rauvolfia serpentina*. *Naturwissenschaften* 72, 432-434

Grill E., (1986)

Phytochelatin, the heavy metal-binding peptides of plants: Characterization and sequence determination. In *Metallothionein 2*, J.H.R. Kägi und Y. Kojima, Edit., Birkhäuser Verlag, Basel.

Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H., (1986a)

Synthesis of seven different homologous phytochelatin

in metal-exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. FEBS Letters 197, 115-120.

Grill E., Gekeler W., Winnacker E.-L., Zenk M.H. (1986b)
Homo-Phytochelatinins are heavy metal-binding peptides of
homo-glutathione containing Fabales. FEBS Letters 205,
47-50

Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H. (1987)
Phytochelatinins, a class of heavy metal-binding peptides
from plants, are functionally analogous to metallo-
thioneins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 439-443

Grob K., Matile P. (1979)
Vacuolar location of glucosinolates in horseradish root
cells. Plant Sci. Lett. 14, 327-335

Grünhage L., Weigel H.-J., Ilge D., Jäger H.-J. (1985)
Isolation and partial characterization of a cadmium-
binding protein from Pisum sativum. J. Plant Phys. 119,
327-334

Hall A. (1980)
Heavy-metal co-tolerance in a copper-tolerant population
of the marine fouling alga, Ectocarpus siliculosus. New
Phytol. 85, 73-78

Hamer D.H. (1986)
Metallothionein. Ann. Rev. Biochem. 55, 913-951

Hamer D.H., Thiele D.J., Lemontt J.E. (1985)
Function and autoregulation of yeast copperthionein.
Science 228, 685-690

Hayashi (1976)
Carboxypeptidase Y. In: Methods in Enzymology, 44, 568-
587. Lorand L., Edit., Academic Press, New York

Hart B.A., Bertram P.E., Scoife B.D. (1979)
Cadmium transport by Chlorella pyrenoidosa. Environ.
Res. 14, 327-335

Heilmaier H.E. (1986)
Untersuchungen zur Analytik, Metallspeicherung und
Induktion von Metallothionein. GSF-Bericht 4/86, Gesell-
schaft für Strahlen- und Umweltforschung, München

Henkin R.I., Aamodt R.L., Foster D.M. (1982)
In: The clinical, biochemical and nutritional aspects of
trace elements. Prasad A.S., (Edit.), A.R. Liss Inc., New
York

Higham D.P., Sadler P.J., Scawen M.D. (1984)
Cd-resistant Pseudomonas putida synthesizes novel Cd
proteins. Science 225, 1043-1046

- Hoagland D.R., Snyder W.C. (1933)
Nutrition of strawberry plants under controlled conditions. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 30, 288-296
- Huang I.-Y., Yoshida A., Tsunoo H., Nakajima H. (1977)
Mouse liver metallothioneins. Complete amino acid sequence of metallothionein-1. *J. Biol. Chem.* 252, 8217-8221
- Ingles A.S. (1983)
Single hydrolysis method for all amino acids, including cysteine and tryptophane. In: *Methods in Enzymology*, 91, 26-41; Hirs C.H.W., Timasheff S.N., Edit., Academic Press, New York
- Jackson P.J., Roth E.J., McClure P.R., Naranjo C.M. (1984). Selection, isolation and characterization of cadmium-resistant *Datura innoxia* suspension cultures. *Plant Phys.* 75, 914-918
- Jaffre T., Brooks R.R., Lee J., Reeves R.D. (1976)
Sebertia acuminata: A hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science* 193, 579-581
- Jocelyn P.C. (1972)
Biochemistry of the SH-group. Academic Press, New York
- Jowett (1958)
Populations of *Agrostis* spp. tolerant to heavy metals. *Nature* 20, 816-817
- Kägi J.H.R., Kojima Y. (1986)
Metallothionein 2. Birkhäuser Verlag, Basel
- Kägi J.H.R., Nordberg M., (1979)
Metallothionein 1. Birkhäuser Verlag, Basel
- Kägi J.H.R., Vallee B.L. (1960)
Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235, 3460-3465
- Kägi J.H.R., Vallee B.L. (1961)
Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* 236, 2435-2442
- Karin M. (1985)
Metallothioneins: Proteins in search of function. *Cell* 41, 9-10
- Karin M., Cathala G., Nguyen-Huu M.C. (1983)
Expression and regulation of a human metallothionein gene carried on an autonomously replicating shuttle vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4040-4044

Karin M., Haslinger A., Holtgreve H., Richards R.I., Krauter P., Westphal H.M., Beato M. (1984)
Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein II A gene. *Nature* 308, 513-519

Keach D., Silver S. (1982)
Energy-dependent arsenate efflux: the mechanism of plasmid-mediated resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6114-6118

Kelly P.C., Brooks R.R., Dilli S., Jaffre T. (1975)
Preliminary observations on the ecology and plant chemistry of some nickel accumulating plants from New Caledonia. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 189, 69-81

Khazaelis M.B., Mitra R.S. (1981)
Cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accommodation to low levels of this ion. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 46-50

Kieffer F. (1984)
Metalle als lebensnotwendige Spurenelemente für Pflanzen, Tiere und Menschen. In: *Metalle in der Umwelt*, Merian E., Edit., Verlag Chemie, Weinheim

Kimura M., Otaki N., Yoshiki S., Horiuchi N., Suda T. (1974). The isolation of metallothionein and its protective role in cadmium-poisoning. *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 340-348

Kimura M., Otaki N., Imano M. (1979)
Rabbit liver metallothionein. Tentative amino-acid sequence of metallothionein-B. In: *Metallothionein 1*, Kägi J.H.R. und Nordberg N., Edit., Birkhäuser Verlag, Basel

Kissling M.M., Kägi J.H.R. (1977)
Primary structure of human hepatic metallothioneins. *FEBS Lett.* 82, 247-250

Kojima Y., Berger C., Vallee B.L., Kägi J.H.R. (1976)
Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 3413-3417

Kondo N., Isobe M., Imai K., Goto T. (1983)
Structure of Cadystin, the unit peptide of cadmium-binding peptides induced in a fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Tetrahedron Lett.* 24, 925-928

Kondo N., Isobe M., Imai K., Goto T. (1984)
Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast. *Tetrahedron Lett.* 25, 3869-3872

Kondo N., Isobe M., Imai K., Goto T. (1985)

Synthesis of metallothionein-like peptides Cadystin A and B occurring in a fission yeast, and their isomers. *Agric. Biol. Chem.* 49, 71-83

Kojima Y., Berger C., Kägi J.H.R. (1976)
Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3413-3417

Kotsonis F.N., Klaassen C.D. (1979)
Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 51, 19-27

Lastowski-Perry D., Otto E., Maroni G. (1985)
Nucleotide sequence and expression of a *Drosophila* metallothionein. *J. Biol. Chem.* 260, 1527-1530

Lehninger A.L. (1972)
Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim

Lerch K. (1980)
Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *Nature* 284, 368-370

Lerch K., Ammer D., Olafson R.W. (1982)
Crab metallothionein. *J. Biol. Chem.* 257, 2420-2426

Linsmaier E.M., Skoog (1965)
Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18, 100-127

Lolkema P.C., Donker M.H., Schouten A.J., Ernst W.O.H. (1984). The possible role of metallothioneins in copper tolerance of *Silene cucubalus*. *Planta* 162, 174-179

Lolkema P.C., Voojls R. (1986)
Copper tolerance in *Silene cucubalus*. *Planta* 167, 30-36

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-273

Lue-Kim H., Rauser W.E. (1986)
Partial characterization of cadmium-binding protein from roots of tomato. *Plant. Phys.* 81, 896-900

Mandelstam J., McQuillen K. (1973)
Biochemistry of bacterial growth. Wiley, New York

Margoshes M., Vallee B.L. (1957)
A cadmium-binding protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4814

Mathys W. (1977)
The role of malate, oxalate and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. *Physiol. Plant.* 40, 130-136

- Mayo K., Palmiter R.D. (1981)
Glucocorticoid regulation of metallothionein-I mRNA synthesis in cultured mouse cells. *J. Biol. Chem.* 256, 2621-2624
- Meister A. (1985)
Glutamate, glutamine, glutathione and related compounds. *Methods in Enzymology*, 113, Acad. Press, New York
- Meister A., Tate S.S. (1976)
Glutathione and other related γ -glutamyl compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 45, 559-604
- Merian E. 1984
Metalle in der Umwelt. Verlag Chemie, Weinheim
- Mobley H.L.T., Rosen B.P. (1982)
Energetics of plasmid-mediated arsenate resistance in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6119-6122
- Mouat M.C.H. (1962)
Genetic variation in root cation-exchange capacity of ryegrass. *Plant Soil* 16, 263-265
- Münger K., Lerch K. (1985)
Copper metallothionein from the fungus *Agaricus bisporus*: Chemical and spectroscopic properties. *Biochem.* 24, 6751-6756
- Murasugi A., Wada C., Hayashi Y. (1981)
Cadmium-binding peptide induced in fission yeast. *J. Biochem.* 90, 1561-1564
- Nicholson C., Stein J., Wilson K.A. (1980)
Identification of the low molecular weight copper protein from copper-intoxicated mung bean plants. *Plant Phys.* 66, 272-275
- Nielson K.B., Winge D.R. (1983)
Order of metal binding in metallothionein. *J. Biol. Chem.* 258, 13063-13069
- Nordberg G.F. (1972)
Cadmium metabolism and toxicity. *Environ. Physiol. Biochem.* 2, 7-36
- O'Hare M.J., Nice E.C. (1979)
Hydrophobic high performance liquid chromatography of hormonal polypeptides and proteins on alkylsilane bonded silica. *J. Chromatogr.* 171, 209-215
- Otvos J.D., Armitage I.M. (1980)
Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7094-7098

Page A.L., Bingham F.T., Nelson C. (1972)

Cadmium absorption and growth of various plant species influenced by solution cadmium concentration. *Environ. Qual.* 1, 283-291

Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Birnberg N.C., Evans R.M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300, 611-615

Peterson P.J. (1969)

The distribution of zinc-65 in *Agrostis stolonifera* L. and *A. tenuis* Sibth. tissues. *J. Exp. Bot.* 20, 863-875

Podell D.N., Abraham G.N. (1978)

A technique for the removal of pyroglutamic acid from the amino terminus of proteins using calf liver pyroglutamate amino peptidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 81, 176-184

Premakumar R., Winge D.R., Wiley R.D., Rajagopalan K.V. (1975). Copper-chelatin: isolation from various eucaryotic sources. *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 278-288

Price C.A. (1957)

A new thiol in legumes. *Nature* 180, 148-149

Prinz R., Weser U. (1975)

A natural occurring Cu-thionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356, 767-776

Rauser W.E. (1984)

Copper-binding protein and copper tolerance in *Agrostis gigantea*. *Plant Sci. Let.* 33, 239-247

Rauser W.E., Curvetto N.R. (1980)

Metallothionein occurs in roots of *Agrostis* tolerant to excess copper. *Nature* 287, 563-564

Rauser W.E., Glover J. (1984)

Cadmium-binding protein in the roots of maize. *Can. J. Bot.* 62, 1645-1650

Rauser W.E., Hartmann H.-J., Weser U. (1983)

Cadmium-thiolate protein from the grass *Agrostis gigantea*. *FEBS Letters* 164, 102-104

Reeves R.D., Baker A.J.M. (1984)

Studies on metal uptake by plants from serpentine and non-serpentine populations of *Thlaspie goesingense*. *New Phytol.* 98, 191-204

Rennenberg H. (1982)

Glutathione metabolism and possible biological roles in

higher plants. *Phytochemistry* 21, 2771-2781

Riddles P.W., Blakeley R.L., Zerner B. (1983)
Reassessment of Ellman's reagent. In: *Methods in Enzymology*, 91, 49-59. Hirs C.H.W., Timasheff S.N., Academic Press, New York

Robinson N.J., Barton K., Naranjo C.W., Sillerud L.O., Trewhella J., Watt K., Jackson P.J. (1986)
Characterization of metal-binding peptides from cadmium-resistant plant cells. In *Metallothionein 2*, Kägi J.H.R. und Kojima Y., Edit., Birkhäuser Verlag, Basel

Robinson N.J., Jackson P.J. (1986)
'Metallothionein-like' metal complexes in angiosperms; their structure and function. *Physiol. Plant.* 67, 499-506

Rupp H., Weser U. (1978)
Circular dichroism of metallothioneins. A structural approach. *Biochem. Biophys. Acta* 533, 209-226

Russel P., Nurse P. (1986)
Schizosaccharomyces pombe and *Saccharomyces cerevisiae*: a look at yeasts divided. *Cell* 45, 781-782

Sasagawa T., Okuyama T., Teller D.C. (1982)
Prediction of peptide retention times in reversed-phase high performance liquid chromatography during linear gradient elution. *J. Chromatogr.* 240, 329-336

Schieder O. (1975)
Regeneration von haploiden und diploiden *Datura innoxia* Mill. Mesophyll-Protoplasten zu Pflanzen. *Z. Naturforschung* 34, 462-466

Schmidt C.J., Hamer D. (1983)
Cloning and sequence analysis of two monkey metallothionein cDNAs. *Gene* 24, 137-146

Schleifer K.H., Kandler O. (1972)
Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36, 407-477

Schroeder W.A. (1972)
Hydrazinolysis. In: *Methods in Enzymology*, 25, 138-143, Hirs C.H.W., Timasheff S.N., Edit., Academic Press, New York

Severne B.C., Brooks R.R. (1972)
A nickel-accumulating plant from Western Australia. *Planta* 103, 91-94

Smith D.G. (1967)
Techniques in enzymic hydrolysis. In: *Methods in Enzymo-*

logy, 11, 214-231; Hirs C.H.W., Edit., Academic Press, New York

Squibb K.S., Cousins R.J. (1974)

Control of cadmium-binding protein synthesis in rat liver. Environ. Physiol. Biochem. 4, 24-30

Squibb K.S., Cousins R.J. (1977)

Synthesis of metallothionein in a polysomal cell-free system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 24-30

Stark G.R. (1972)

Sequential degradation of peptides and proteins from their COOH-termini with ammonium thiocyanate and acetic anhydride. In: Methods in Enzymology, 25, 369-384; Hirs C.H.W., Timasneff S.N., Edit., Academic Press, New York

Steinkamp R., Rennenberg (1985)

Degradation of glutathione in plant cells: evidence against the participation of a γ -glutamyltranspeptidase. Z. Naturforschung C, 40, 29-33

Swank R.T., Munkries K.D. (1971)

Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamid gel with sodium dodecyl sulfate. Anal. Biochem. 39, 462-477

Thiele D.J., Walling M.J., Hamer D.H. (1986)

Mammalian metallothionein is functional in yeast. Science 231, 854-856

Tukendorf A., Lyszc S., Baszynski (1984)

Copper-binding proteins in spinach tolerant to excess copper. J. Plant Physiol. 115, 351-360

Turner R.G. (1970)

The subcellular distribution of zinc and copper within the roots of metal tolerant clones of Agrostis tenuis. New Phytol. 69, 725-731

Turner R.G., Marshall C. (1972)

The accumulation of Zn by subcellular fractions of roots of Agrostis tenuis Sibth. New Phytol. 71, 671-676

Tynecka Z., Gos Z., Zajac J. (1981)

Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in Staphylococcus aureus. J. Bact. 147, 313-319

Ulbrich B., Zenk M.H. (1979)

Partial purification of hydroxycinnamoyl-CoA:guinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. Phytochem. 18, 929-933

Umweltbundesamt 1980

Was sie schon immer über Umweltchemikalien wissen wollten. Bundesministerium des Inneren, Edit., Verlag Kohlhammer, Stuttgart

Vallee B.L. 1979

Metallothionein: historical review and perspectives. In: Metallothionein 1, Kägi J.H.R. und Nordberg M., Edit., Birkhäuser Verlag, Basel

Vallee B.L., Ulmer D.D. 1972

Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann. Rev. Biochem. 41, 91-128

Vasak M., Berger C., Kägi J.H.R. (1984)

Dynamic structure of metallothionein. FEBS Letters 168, 174-178

Wainwright S.J., Woolhouse H.W. (1975)

Physiological mechanisms of heavy metal tolerance in plants. In: The ecology of resource, degradation and renewal. 231-259, Chadwick M.J., Goodman G.T., Edit., Blackwell, Oxford

Wagner G.J. (1985)

Characterization of a cadmium-binding complex of cabbage leaves. Plant Physiol. 76, 797-805

Wagner G.J., Trotter M.M. (1982)

Inducible cadmium-binding complexes of cabbage and tobacco. Plant Physiol. 69, 804-809

Webb M., Cain K. (1982)

Functions of metallothionein. Biochem. Pharmacol. 31, 137-142

Weigel H.J., Jäger H.J. (1980)

Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plants. Plant Phys. 65, 480-482

Wellner D. (1971)

L-Amino acid oxidase (snake venom). In: Methods in Enzymology, 17B, 597-600; Tabor H., Tabor C.W., Edit., Academic Press, New York

Williams R.J.P. (1984)

Zinc: what is its role in biology. Endeavor 8, 65-70

Winnacker E.-L. (1984)

Gene und Klone. Verlag Chemie, Weinheim

Wu L., Antonovics J. (1975)

Zinc and copper uptake of *Agrostis stolonifera*, tolerant to both zinc and copper. New Phytol. 75, 231-237

Zenk M.H. (1978)
The impact of plant tissue culture on industry. In:
Frontiers of Plant Tissue Culture; Thorpe T.A., Edit,
Calgary

DANKSAGUNG

Für viele lehrreiche Erfahrungen, Unterstützung und vor allem wissenschaftliche Schulung möchte ich Herrn Prof. Dr. M.H. Zenk meinen allergrößten Dank aussprechen.

Herr Prof. Dr. E.-L. Winnacker schuf die Grundlage zu der vorliegenden Arbeit durch seinen Vorschlag, Metallothioneine in Pflanzen zu untersuchen. Dafür möchte ich mich von Herzen bedanken.

Einen großen Beitrag zum Gelingen der Peptidsequenzierung leistete Herr Priv. Doz. Dr. R. Hensel, München, durch seine Ratschläge und die mir erteilte Einführung in die Technik des modifizierten Edmanabbaus. Für sein Interesse, aber auch für die großzügige Erlaubnis sein Labor zu benützen, insbesondere den Aminosäureanalysator, gilt Herrn Dr. Hensel mein großer Dank.

Die Durchführung vieler Metallanalysen verdanke ich Herrn P. Hartl, Anorganische Chemie, LMU-München.

Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. A. Meister, New York, für seinen Vorschlag, Buthioninsulfoximin zu verwenden.

Herrn Prof. Dr. G. Snatzke, Bochum, danke ich für die Messung der CD-Spektren von Cadmium-Phytochelatin.

Auch möchte ich Frl. S. Kunz danken für die selbständig und zuverlässig durchgeführten Versuche zur PC-Induktion durch verschiedenste Schwermetalle und für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

All jenen, nicht namentlich erwähnten gehört mein Dank, die durch Rat und Tat, wie das 'Zellkulturlabor', am Erfolg der Arbeit Anteil hatten.

Dem Bundesminister für Forschung und Technologie, Bonn, ist die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen eines Projekts der Laboratorien für Molekulare Biologie der Universität München zu verdanken.

LEBENS LAUF

Am 7. Februar 1957 wurde ich, Erwin Grill, als drittes Kind von Rudolf Grill und seiner Ehefrau Elfriede in München geboren.

Nach Besuch der Volksschule in den Jahren 1963-1967 wechselte ich auf das Maria-Theresia-Gymnasium in München.

Im Jahre 1976 erhielt ich die 'Allgemeine Hochschulreife' und begann im Winter des gleichen Jahres an der Technischen Hochschule München Biologie zu studieren.

Parallel zum Studium erhielt ich an der Bayerischen Staatslehranstalt für Photographie, München, eine Ausbildung zum Fotografen, die im September 1976 begann und im Juli 1978 erfolgreich beendet wurde.

Die Diplomprüfung mit Fachrichtung Mikrobiologie absolvierte ich im April 1982. Nach Abschluß der Diplomarbeit, begann ich im August 1983 mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. Zenk.

Seit August 1983 bin ich als wissenschaftliche Hilfskraft teilzeitbeschäftigt.

